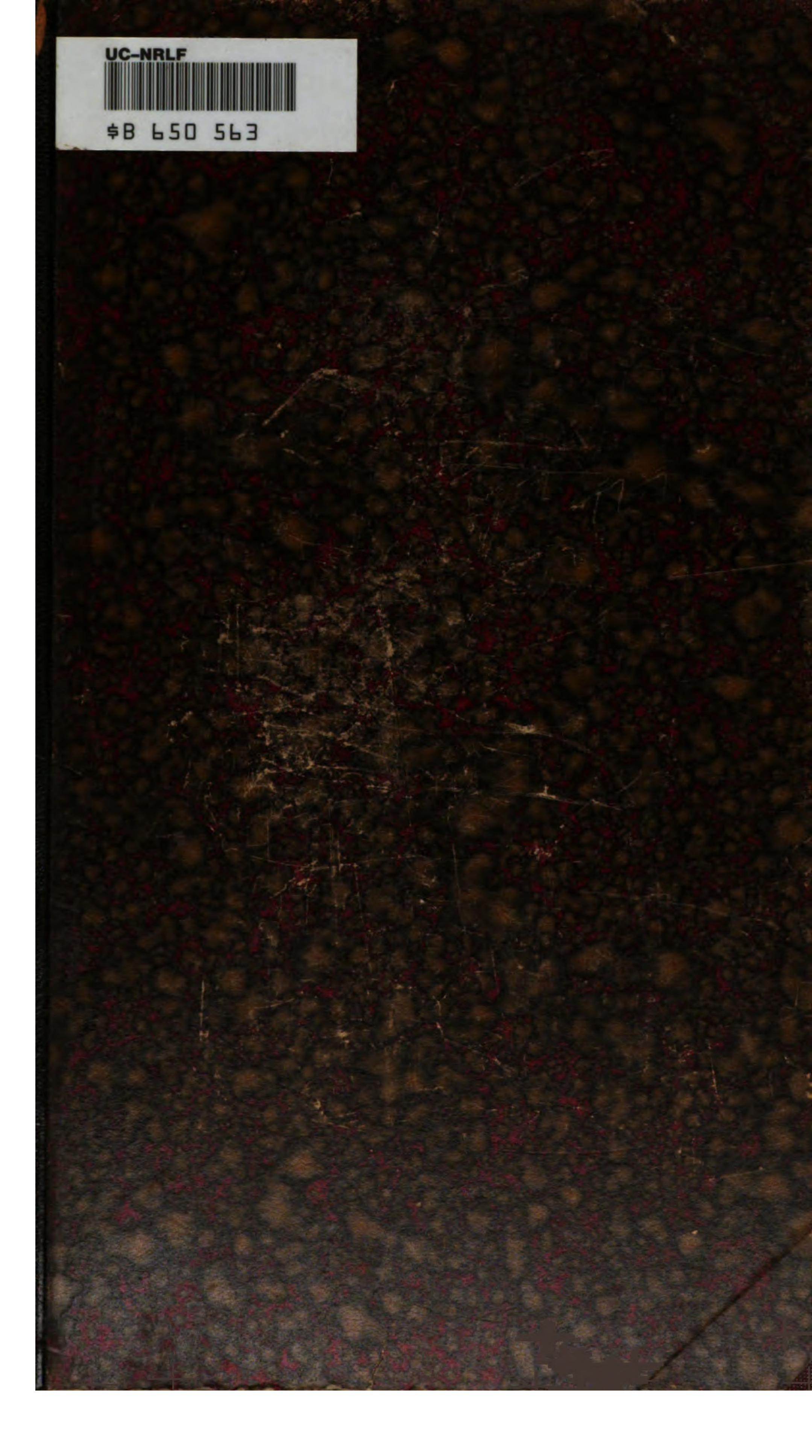
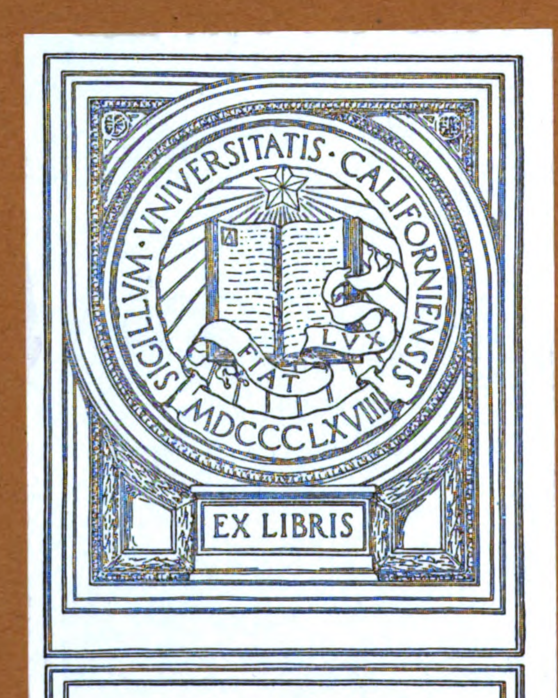
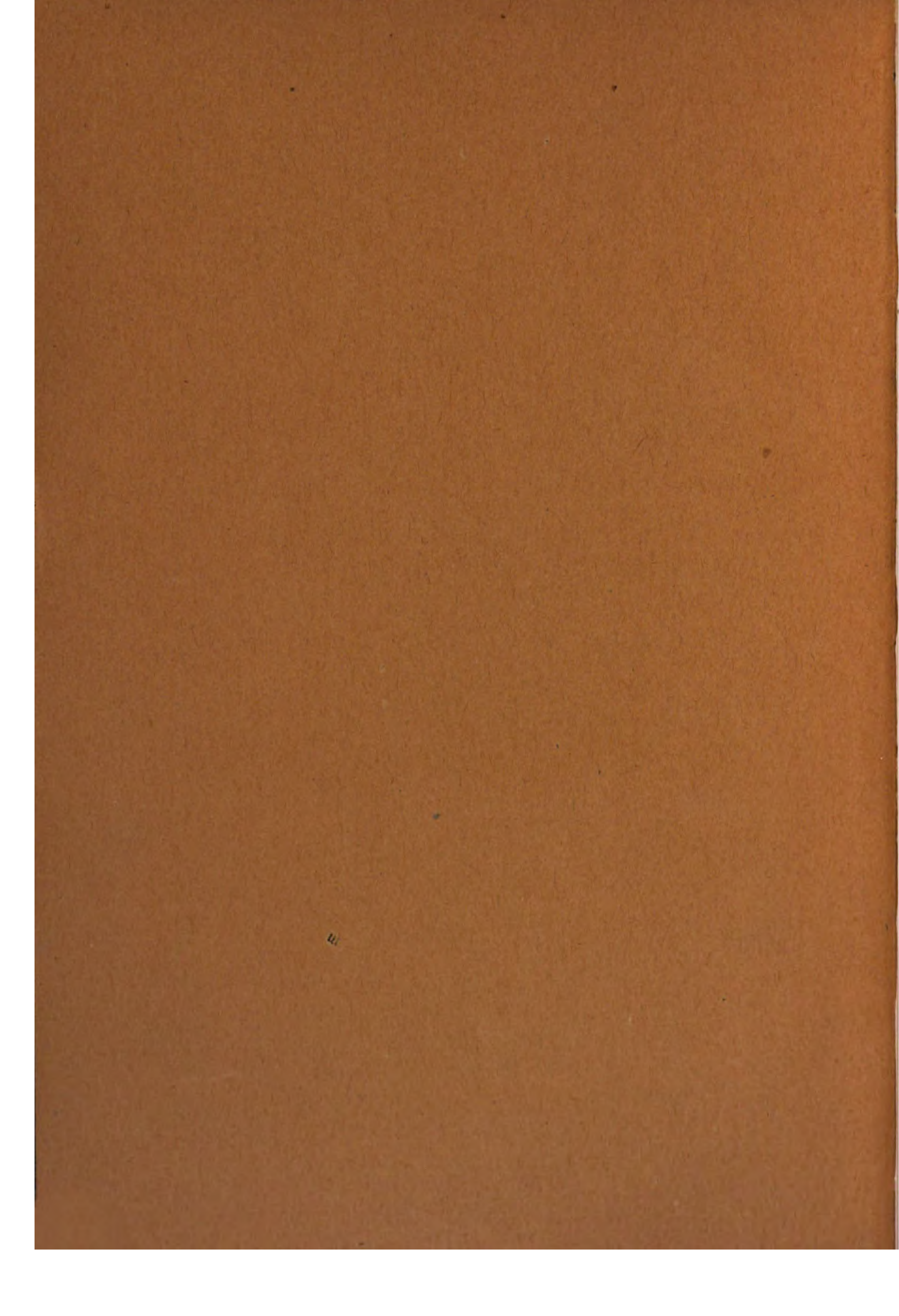
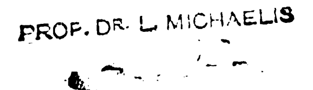

UC-NRLF
$B 650 563


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS









Biochemische Zeitschrift.

Herausgegeben von

E. Buchner-Berlin, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **C. von Noorden**-Wien, **E. Salkowski**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

L. Asher-Bern, **J. Bang**-Lund, **P. Bergell**-Berlin, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **Chr. Bohr**-Kopenhagen, **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Berlin, **G. Embden**-Frankfurt a. M., **E. Freund**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **H. J. Hamburger**-Groningen, **A. Heffter**-Marburg, **M. Jacoby**-Heidelberg, **R. Kobert**-Rostock, **M. Kumagawa**-Tokio, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New-York, **L. von Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-Berkeley, **A. Loewy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New-York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **L. Michaelis**-Berlin, **J. Morgenroth**-Berlin, **W. Nernst**-Berlin, **R. Pfeiffer**-Königsberg, **Ch. Porcher**-Lyon, **F. Roehmann**-Breslau, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **Zd. H. Skraup**-Wien, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **E. H. Starling**-London, **F. Tangl**-Budapest, **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **J. Traube**-Charlottenburg, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Dritter Band.

Mit drei Tafeln.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1907.

Inhaltsverzeichnis.

Über die Lichtabsorption und den Eisengehalt des Blutfarbstoffes.

Von

Hans Aron.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Kgl. Landw. Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1906.)

Im Gegensatz zu der älteren, allgemein verbreiteten Anschauung, daß der Blutfarbstoff der höheren Tiere ein einheitlicher, chemisch wohldefinierter Körper sei, ist in neuerer Zeit vornehmlich von Bohr[1]) die Ansicht vertreten worden, daß im Blute ein Gemisch verschiedener Hämoglobine (α, β, γ) von verschiedener Lichtabsorption, verschiedenem Eisengehalt und verschiedenem Sauerstoffbindungsvermögen vorliege. Bei der Untersuchung einer großen Zahl ganz frischer, mit 0,1 % iger Sodalösung verdünnter Blutproben anscheinend gesunder Tiere hatten Franz Müller und Verf.[2]) für das Verhältnis der beiden Lichtextinktionskoeffizienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ keine konstanten Werte gefunden[3]), wie man das für einen einheitlichen Blutfarbstoff mit Hüfner[4]) fordern müßte.

Zum Verständnis dieser Bestimmungen, die mit dem Hüfnerschen Spektrophotometer nach Hüfners Vorschrift ausgeführt wurden, sei nur gesagt, daß der Extinktionkoeffizient ε die Lichtabsorption im Bezirk

---

[1]) Bohr, Skand. Arch. 8, 10ff. und Nagels Handbuch 1, 1, 70.

[2]) Aron und Müller, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1906, Suppl. 109 bis 132.

[3]) Anm. während der Korrektur: Auf die soeben von v. Zeynek gegen unsere Messungen erhobenen Einwände (Ztschr. f. physiol. Chem. 49, 467) erwidern Müller und ich an der gleichen Stelle.

[4]) Hüfner, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1894, 132.

zwischen den Wellenlängen $\lambda = 569-557\ \mu$ entsprechend der Mittelregion zwischen den beiden Spektralstreifen des Oxyhämoglobins und der Extinktionskoeffizient ε' die Lichtabsorption der Blutfarbstofflösung im Bezirk zwischen $\lambda = 546-534\ \mu$ entsprechend der dunkelsten Partie des im Grün gelegenen sogenannten β-Streifens des Oxyhämoglobins ausdrückt. Im übrigen muß auf die zitierte Abhandlung verwiesen werden, in der auch das Prinzip der Methode, sowie die beobachteten Kautelen kurz erläutert werden.

Auch bei der jetzigen Fortsetzung dieser Untersuchungen weisen wieder die an ganz frischem Pferde-, Kälber-, Hunde-, Kaninchen- und Katzenblut gefundenen Werte für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ die methodische Fehlermöglichkeit weit überschreitende Differenzen (1,37—1,57) auf. Bei einer Reihe von Messungen mit dem von ihm konstruierten Mikrospektralphotometer[1]) hat auch Th. W. Engelmann für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ ebenfalls recht schwankende Werte erhalten und das Resultat dieser Messungen, das von dem unserigen vollständig bestätigt wird, im Anschluß an unsere erste Mitteilung jetzt kurz veröffentlicht[2]).

Es war auffällig, daß unter den von der Mittelzahl abweichenden Werten besonders häufig niedrige Werte für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ vorkommen und es erschien das Vorhandensein noch eines zweiten Farbstoffes wahrscheinlich, dessen Lichtabsorption in den untersuchten Spektralbezirken von der des Oxyhämoglobins abweicht und zwar so, daß die Extinktionskoeffizienten ε' und ε um einen geringeren Betrag differieren, die Verhältniszahl also kleiner ist. Von den bekannten Derivaten des Oxyhämoglobins kämen hier vor allem das reduzierte Hämoglobin und das Methämoglobin in Betracht. Da das Vorhandensein reduzierten Hämoglobins in unseren Versuchen ausgeschlossen werden konnte[3]), liegt der Verdacht, der schon früher von uns ausgesprochen wurde, nahe, daß die beobachteten Abweichungen auf eine Beimischung von Methämoglobin zurückzuführen sind.

Ich habe mich deshalb bemüht, durch die folgenden Untersuchungen einmal den sicheren Nachweis zu erbringen, daß es sich hier in der Tat um das Vorhandensein von Methämoglobin in

---

[1]) Ztschr. f. wiss. Mikroskopie **5**, 289. 1889. Sitzungs-Berichte der Akad. d. Wiss. Berlin 26, **6**. 1902.

[2]) Verhandlungen der Pysiol. Gesellsch. Berlin **1906**, 53/54.

[3]) Durch Sättigen mit Luft.

frischen Blutproben handelt, weiter aber die Bedingungen der Entstehung des Methämoglobins näher kennen zu lernen, vor allem im Hinblick auf die Frage, ob das Methämoglobin als normaler Bestandteil der Erythrocyten oder als „Zersetzungsprodukt“ (Hüfner u. v. Zeynek[1]) des Blutfarbstoffes anzusprechen ist.

Zum Nachweis des Methämoglobins schien es mir am geeignetsten zu versuchen, das Methämoglobin, das wir in den Blutproben annehmen, wenn möglich in Oxyhämoglobin zu verwandeln; dann müßte eine Erhöhung des Quotienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ zu konstatieren sein. Methämoglobin läßt sich leicht zu Hämoglobin reduzieren; so wird z. B. bei der sogenannten Selbstreduktion im Blut enthaltenes Methämoglobin nach einiger Zeit zu Hämoglobin reduziert. Dieses kann durch Sättigen mit Luft zu Oxyhämoglobin oxydiert und auf diesem Wege die gewünschte Umwandlung von Methämoglobin in Oxyhämoglobin erzielt werden[2]).

Zuerst habe ich mich durch spektroskopische Untersuchungen mehrfach davon überzeugt, daß Blut einer mit Anilin vergifteten Katze, welches ganz bräunlich war und deutlich den Methämoglobinstreifen gab, in ein Reagenzglas eingeschmolzen einige Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, kirschrot wurde und jetzt bei Arterialisierung mit Luft ein reines Oxyhämoglobinspektrum zeigte.

Ich habe diese Selbstreduktion dann mit den frischen Blutsodalösungen, wie sie zur spektrophotometrischen Untersuchung benutzt werden, auszuführen versucht, aber mit negativem Erfolge.

Nur kurze Zeit (ca. 3 × 24 Stunden) unter Luftabschluß aufbewahrte frische Blutsodalösungen (1 Blut : 50 oder : 100 Sodalösung) reduzieren sich wohl zum Teil, der Quotient $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ ist aber nach Arterialisierung meist gleich dem der frischen Lösung. Frei an der Luft stehend zersetzen sich diese Lösungen unter Herabgehen des Quotienten; nach einigen Tagen färben sich sie bräunlich und zeigen bei der spektroskopischen Untersuchung den Methämoglobinstreifen im Rot. Diese Zersetzung tritt übrigens sicherlich nicht in der Zeit ein, in der auch bei langsamster und sorgfältigster Arbeit die Lösung am Spektrophotometer steht. Ich habe verschiedene Male 1 bis 2 Stunden nach der Bestimmung die Ablesungen wiederholt und dabei niemals Werte bekommen, die außerhalb der methodischen Fehlergrenze von den ersten differierten. Da nun durch Ferricyankalium-Zusatz methämoglobinhaltig gemachtes Blut mit

[1]) Hüfner, a. a. O. v. Zeynek, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1899, 464 ff.

[2]) Jäderholm, Ztschr. f. Biologie 16, 1—24. Araki, Ztschr. f. physiol. Chem. 14, 405—415.

Sodalösung ca. 100fach verdünnt nach 8tägigem Stehen unter Luftabschluß kein Verschwinden des Methämoglobinstreifens zeigte, muß man annehmen, daß die im so stark verdünnten Blut vorhandenen reduzierenden Substanzen keine genügende Wirkung entfalten. Ich habe deshalb noch versucht durch Zusatz reduzierender Stoffe wie Ferrum reductum und frischen Muskels eine schnellere und energischere Reduktion zu erzielen. Ferrum reductum scheint ohne Einfluß zu sein. Nach Zusatz von Muskeln reduzieren sich Blut-Sodalösungen sehr schnell. Diese Lösungen lassen sich aber, wohl weil zu viel reduzierende Substanzen in die Lösung übergehen, nur schwer wieder oxydieren und werden selbst an der Luft schnell wieder venös, was eine spektrophotometrische Untersuchung unmöglich macht.

Schließlich bin ich dazu übergegangen, die Reduktion im unverdünnten Blute vorzunehmen.

So wurde zu den folgenden Versuchen wahllos von einer ganzen Reihe frisch zur spektrophotometrischen Untersuchung gekommener Blutproben je ca. 10 ccm Blut so in ein Reagenzglas eingeschmolzen, daß nur noch ein Luftraum von höchstens 10 ccm blieb, der Rest des Blutes in einer verschlossenen Flasche, die fast vollständig gefüllt war, verwahrt und beides bei Zimmertemperatur (ca. 20° C.) einige Zeit (bis zu 4 Wochen) aufgehoben. Das Blut reduzierte sich energisch und war meist schon am nächsten Tage venös. Nach einiger Zeit wurde von den so aufgehobenen Blutproben eine bestimmte Menge mit Sodalösung verdünnt, mit Luft arterialisiert und wieder ε und ε' im Spektrophotometer bestimmt.

Aus diesen Versuchen, die in Tabelle I zusammengestellt sind, geht hervor, daß bei keiner der unter Luftabschluß aufgehobenen Proben auch bei Aufbewahrung bis zu vier Wochen ein Herabgehen des Quotienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ unter den ersten gleich nach der Entnahme gefundenen Wert beobachtet wurde. Die kleinen Abnahmen, die sich in der Tabelle finden (8, 9), sind ohne Bedeutung, da sie innerhalb der Fehlergrenze liegen. Von einer Methämoglobinbildung ist also keine Rede. Die Proben, welche frisch schon einen höheren Wert für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ ergeben hatten, zeigen auch nach wochenlanger Aufbewahrung noch den gleichen Wert für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$. Dagegen sehen wir, daß diejenigen Proben, welche frisch einen niedrigen Wert für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ aufweisen, nach Selbstreduktion und Wiederarterialisierung regelmäßig einen höheren Quotienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ liefern, als frisch der Ader entnommen. Das Heraufgehen des Wertes $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ übersteigt bei den Proben, die

Tabelle I.

Tier	Datum	Verdünnung	s	s'	$\frac{s'}{s}$	Nr.	Behandlung	Die Verdünnung ist	s	s'	$\frac{s'}{s}$
1. Pferd III . .	14. VI.	stets 9,9325 Blut : 99,822 Soda	0,56156	0,80000	1,424	1a.	2 Proben bis 30. VI. eingeschmolzen	dieselbe	0,61908	0,92156	1,489
						1b.		"	0,60786	0,91746	1,509
2. Pferd VI . .	2. VII.		0,64575	0,93944	1,455	2a.	bis 25. VII. in verschlossener Flasche aufbewahrt . . .	anders	0,61576	0,92430	1,501
3. Kalb II . .	23. VI.		0,41074	0,56384	1,373	3a.	bis 11. VII. eingeschmolzen	"	0,67998	0,97164	1,429
4. Kalb V . . .	21. VI.		0,45700	0,63794	1,396	4a.	in verschlossener Flasche aufbewahrt bis 13. VII.	dieselbe	0,49484	0,71508	1,445
						4b.	" 17. VII.	"	0,49506	0,71694	1,448
5. Kalb IV, 1 .	21. VI.		0,60154	0,85022	1,414	5a.	bis 12. VII. eingeschmolzen	anders	0,68441	1,01492	1,483
						5b.	bis 13. VII. in verschlossener Flasche	dieselbe	0,61560	0,89928	1,461
6. Kalb IV, 2 .	2. VII.		0,56234	0,81768	1,474	6a.	in verschlossener Flasche aufbewahrt bis 26. VII.	"	0,56962	0,84476	1,483
						6b.	" 30. VII.	"	0,57928	0,88114	1,521
						6c.	" do.	anders	0,45062	0,67880	1,506
						6d.	" 5. VIII.	"	0,46114	0,70952	1,539
7. Kalb III . .	3. VII.		0,51576	0,73044	1,416	7a.	bis 22. VII. in verschlossener Flasche	dieselbe	0,52966	0,78752	1,487
8. Kalb VI . .	5. VII.		0,53364	0,79930	1,498	8a.	bis 1. VIII. in verschlossener Flasche . . .	anders aber gleich	0,58477	0,86354	1,477
						8b.	bis 1. VIII. eingeschmolzen .		0,57304	0,85774	1,497
9. Pferdeoxalatblut	26. VII.		0,55036	0,84056	1,527	9a.	bis 4. VIII. in verschlossener Flasche	dieselbe	0,54242	0,82190	1,515
10. Kaninchen A.	12. VI.		0,51828	0,76788	1,481	10a.	bis 23. VI. eingeschmolzen .	anders	0,74810	1,11932	1,497

anfänglich auffällig niedrige Werte hatten, weit den methodischen Fehler, der nach früheren Erörterungen[1]) im Höchstfalle 0,05 betragen kann. Diese Beobachtung kann wohl nur so gedeutet werden, daß Methämoglobin reduziert und dann in Oxyhämoglobin übergeführt ist, und diese Ansicht findet auch in dem Verhalten von ε und ε' eine Stütze: Wenn nämlich in einer Blutfarbstofflösung ein Teil des Oxyhämoglobins in Methämoglobin verwandelt wird (durch Zusatz von einer Spur Ferricyankalium oder Äther), so nimmt, wie schon Müller und ich gelegentlich ausgeführt haben, die Lichtabsorption im Gebiete $\lambda = 546$—$534\ \mu$ stärker ab als im Gebiete $\lambda = 569$—$557\ \mu$, d. h. ε' verringert sich mehr als ε. Dies zeigt z. B. folgender Versuch:

Blutsodalösung: 1 ccm Blut : 100 Soda	ε	ε'	$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$
frisch	0,51484	0,74518	1,448
mit Äther hämolysiert	0,44350	0,51852	1,169
mit Ferricyankal.-Zusatz hämolysiert	0,44268	0,52708	1,190
frisch	0,68441	1,01492	1,483
mit Äther-Zusatz	0,57884	0,67704	1,170

Umgekehrt muß bei Überführung von Methämoglobin in Oxyhämoglobin die Lichtabsorption zunehmen und zwar wiederum ε' mehr als ε. In den in Betracht kommenden Versuchen (1, 4, 5, 6, 7) ist nun tatsächlich mit dem Heraufgehen des Quotienten stets eine relativ geringe Zunahme von ε, eine größere von ε' zu konstatieren.

In den frisch arterialisierten Proben war also zweifellos Methämoglobin neben Oxyhämoglobin vorhanden; beide sind bei der Selbstreduktion zu Hämoglobin reduziert und bei der jetzt vorgenommenen Arterialisierung zu Oxyhämoglobin oxydiert worden.

Es scheint, als ob durch die reduzierenden Stoffe des Blutes nicht nur Methämoglobin zu Hämoglobin reduziert, sondern auch von vornherein die Bildung von Methämoglobin in einer Blutlösung unterbunden wird. Wird Stokessche Lösung zu Blut gegeben, so vermag ein Zusatz eines Methämoglobin bildenden Stoffes in sonst sicher Methämoglobin bildender Konzentration und Menge den Blutfarbstoff nicht zu verändern[2]) und ähnlich wirken die reduzierenden Substanzen des Blutes. Eine Blutprobe, die einige Zeit bei Luftabschluß[3]) gestanden hat, oder eine frische Probe, die

[1]) Aron u. Müller a. a. O.

[2]) Vergl. auch Marchand, Virchows Archiv 77, 55 u. 488.

[3]) Es bedarf, wie ich mich durch einige weitere Versuche über den Vorgang der Selbstzehrung überzeugt habe, übrigens nicht einmal des

mit gehacktem Muskel versetzt wird, bleibt beim Stehen an der Luft violett (reduziertes Hämoglobin), und zeigt auch nach vielfachem Schütteln mit Luft, selbst nach Zusatz geringer Mengen Ferricyankalium und wochenlangem Stehen bei spektroskopischer Untersuchung keinen Methämoglobinstreifen im Rot, während eine Kontrollprobe allein beim Stehen an der Luft schon nach mehreren Tagen deutliche Methämoglobinbildung aufweist.

Eine weitere Reihe von Versuchen sollte mir nun zeigen, wie im Hinblick auf diese Feststellungen die im Tierkörper stattfindenden Reduktionsvorgänge auf den Blutfarbstoff einwirken, d. h. ob und wieweit diese das Methämoglobin beeinflußen.

Unter normalen Bedingungen enthält das venöse Blut noch einen solchen Überschuß von Sauerstoff, daß eine Wirkung der reduzierenden Stoffe nirgends stattfinden kann. Denn die Reduktion des Methämoglobins kommt nur zustande, wenn kein freier O_2 und kein Oxyhämoglobin mehr vorhanden sind. Ich fand auch in gleichzeitig aus Arteria carotis und Vena jugularis entnommenen Blutproben nach Arterialisierung innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmende Werte für das Extinktionskoeffizientenverhältnis $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ z. B.

	Blut aus	V. jugul.	A. carot.
Kaninchen I	normal	1,517	1,499
„ II	„	1,477	1,473
Kalb VIII	anämisch	1,480	1,454

Es scheinen jedoch die im venösen Blut gefundenen Werte die Tendenz zu zeigen, gegenüber den im arteriellen gefundenen zuzunehmen; besonders tritt dies bei dem anämischen Kalb hervor, dessen O_2-Verbrauch im venösen Blut ein größerer, d. h. die Reduktion weitergehend als bei den normalen Tieren ist.

Anders dagegen, wenn man die Sauerstoffzufuhr einschränkt. Jetzt wird sicherlich, trotz des O_2-Gehaltes des Blutes der großen Venen, in einigen Kapillargebieten[1]) der freie Sauerstoff verbraucht, das Blut vollständig reduziert und infolge des Sauerstoffmangels[2]) von den Geweben reduzierende Stoffe an das Blut abgegeben. Die Bedingungen für eine Reduktion im Blute vorhandenen

---

sorgfältigen Luftabschlusses. Wird Blutkörperchenbrei im Reagenzglas mit physiologischer Kochsalzlösung überschichtet, so daß die Kochsalzschicht vielleicht fünfmal so hoch als die Blutkörperchenschicht ist, so tritt bei mehrtägigem Stehen ebenfalls Selbstreduktion des Blutes ein.

[1]) Zuntz, Löwy, Müller, Caspari, Höhenklima und Bergwanderungen usw. Berlin 1906.

[2]) Zuntz, Verh. Physiol. Gesellsch. Berlin. 7. IV. 05.

Methämoglobins sind also gegeben. War die Reduktion energisch, so wird analog den Reagensglasversuchen nach Arterialisierung jetzt weniger Methämoglobin gefunden werden.

Meine recht primitive Versuchsanordnung war folgende: Nachdem ich mich an einer kleinen Probe überzeugt hatte, daß das Blut des Tieres zurzeit einen niedrigen Quotienten hatte, wurde in Arteria carotis (oder Vena jugularis) eine Kanüle eingebunden, eine Blutprobe entnommen und genau untersucht. Dann wurde die Trachea durch einen Schraubenquetschhahn allmählich verengt und eine nach Belieben regulierbare starke Dyspnoe erzeugt. Das Tier war sorgfältig mit Tüchern zugedeckt, die Operationsstelle durch Watte geschützt. Nach einige Zeit dauernder Dyspnoe wurde eine zweite Blutprobe entnommen. Bei diesen Versuchen floß fast schwarzes Blut aus der Arterie.

Tabelle II.

Tier	Blut aus	$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ vor dem Versuch	Behandlung	$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	Bem.
Kaninchen A.	A. carot.	1,481	Ohr 5 Min. durch Gummiring verschlossen, Ohrenvenenblut . .	1,492	Keine Wirkung!
			Trachea 3′ verschlossen, Blut aus A. carot. . .	1,485	
Kaninchen B.	V. jug.	1,455	Trachea 40′ stark verengt, Atemstillstand, während dessen Blut aus V. jug.	1,534	
Kaninchen C.	A. carot.	1,456	Trachea 10′ verengt, starke Dyspnoe, Blut aus A. carot.; vor zweiter Blutentnahme Tier erstickt	1,502	
Katze	A. carot. (Vor Versuch etwas Chloroform)	1,383	Trachea 25′ verengt, Blut aus A. carot. .	1,484	
			Trachea 10′ fast verschlossen; sehr stark Dyspnoe	1,495	

So wurden obige Versuchsresultate erhalten, aus denen sich ergibt, daß die Menge des im frischen Blut gefundenen Methämoglobins ceteris paribus geringer ist, wenn man durch mangelhafte O_2-Zufuhr die Reduktion des Blutes verstärkt. Gleichzeitig zeigen diese Versuche, daß Methämoglobin durch Reduktion — auch im Tierkörper — in Hämoglobin und aus diesem durch Oxydation in Oxyhämoglobin übergeht.

Die nächstliegende Frage ist nun: Ist dieses Methämoglobin auch im Körper vorhanden gewesen, oder ist es erst außerhalb

des Körpers gebildet worden? Wir können durch unsere spektrophotometrische oder spektrale Untersuchung des Blutfarbstoffs immer nur feststellen, welche Modifikation der beiden Sauerstoffverbindungen des Hämoglobins resp. Mischung dieser beiden nach der Sättigung mit Luft eine gewisse Zeit nach der Blutentnahme, wie sie der Transport des Blutes ins Laboratorium die Vorbereitung und Ausführung der Untersuchung erfordert, vorhanden ist. Dasselbe ist auch bei allen den Untersuchungen der Fall, welche sich mit der Frage der Gasbindung (Sauerstoff, Kohlenoxyd usw.) des Blutes beschäftigen. Man ist allgemein geneigt, Methämoglobin in solchen Blutproben als Zersetzungsprodukt ursprünglich vorhandenen Oxyhämoglobins anzusehen, weil der Übergang des den Sauerstoff in dissoziabler Form enthaltenden Oxyhämoglobins in das den Sauerstoff fest gebunden führende Methämoglobin für einen typischen Zersetzungsvorgang des Blutfarbstoffes gilt. Tatsächlich geht aber außerhalb des Körpers Oxyhämoglobin ebenso leicht in Methämoglobin über, wie Methämoglobin (via Hämoglobin) in Oxyhämoglobin. Es handelt sich nur um die Frage, ist Sauerstoff im Überschuß vorhanden oder findet eine Sauerstoffzehrung statt? Der Übergang der lockeren Sauerstoffbindung (O—Hb) in die feste Sauerstoffbindung (Met—Hb) und der umgekehrte Vorgang sind meines Erachtens als gleichwertige Umwandlungen anzusehen. Wenn wir berücksichtigen, daß Methämoglobin niemals direkt wieder in Oxyhämoglobin übergeführt werden kann, sondern nur durch Reduktion zu Hämoglobin und folgende Oxydation, so können wir diese Umwandlungen folgendermaßen formulieren:

$$\mathrm{O\,Hb} \xrightarrow{\hspace{3em}} \mathrm{Met\,Hb}$$
$$\mathrm{O\,Hb} \leftarrow (\mathrm{Hb} + \mathrm{O_2}) \leftarrow \mathrm{Met\,Hb}$$

Diese Reaktion könnte als ein Beispiel für eine Klasse reversibler Vorgänge angesehen werden, die Pauli[1]) als „heterodrom reversibel" bezeichnet hat, d. h. die bei Umkehr der Bildungsbedingungen auf einem anderen Wege wieder zu dem Ausgangsprodukte führen.

Es spricht aber nichts dagegen, daß der Blutfarbstoff im Tierkörper ebenso reagiert, wie ganz kurze Zeit nach der Blutentnahme und deshalb ist es das nächstliegende, anzunehmen, daß die Oxydationen im Tierkörper ebenso verlaufen, wie ganz kurze Zeit

---

[1]) Ergebn. d. Physiologie III (Biochem. Abtlg.).

nach der Entnahme des Blutes im Reagenzglase. Mit anderen Worten, wenn wir hier nach der Sättigung mit Luft neben Oxyhämoglobin Methämoglobin finden, daraus zu schließen, daß dieses Methämoglobin ebenso nach der Arterialisation des Blutes in den Lungen des Tieres vorhanden ist. Und diese Annahme dürfte wohl umsomehr berechtigt sein, als wir in dem sicher „zersetzten“ Blut, nachdem es reduzierenden Einwirkungen ausgesetzt war, nach Arterialisierung weniger Methämoglobin finden! Da es eine Zahl physiologisch im Blut enthaltener Stoffe[1])[2]), die Methämoglobin bilden (Toxine, Bakterien), gibt, bietet die Entstehungsmöglichkeit des Methämoglobins im normalen Blut keine Schwierigkeiten: eine Frage, die auch schon von anderen erwogen worden ist[3]).

Nach unseren Versuchen ist ein Faktor, der die Größe der Methämoglobinbildung beeinflußt, die Intensität der Reduktion des Blutes, d. h. der Gehalt an den sogenannten reduzierenden Substanzen des Blutes. Wenn aber dieser wirklich mit der Größe der gefundenen Methämoglobinmenge in ursächlichem Zusammenhange steht, so kann es uns nicht mehr Wunder nehmen, daß in einer großen Zahl frischer Blutproben differierende Mengen Methämoglobin gefunden wurden, denn nicht nur in so extremen Fällen, wie den von mir durch Dyspnoe experimentell erzeugten, sondern auch im „normalen“ Blut schwankt der Gehalt an reduzierenden Substanzen beträchtlich, wie sich das in der wechselnden Größe und Geschwindigkeit der „Selbstzehrung“ des Blutes zu erkennen gibt[4]).

Die Anwesenheit wechselnder Mengen von Methämoglobin nach der Arterialisierung des Blutes könnte nun weiterhin die Erklärung für die von verschiedenen Autoren gefundenen Variationen in der Sauerstoffbindung des Blutfarbstoffes liefern.

Diejenigen Forscher nämlich, die am lebenden Blut experimentiert haben[5]), haben schwankende Werte gefunden gegenüber jenen[6]), die nur

---

[1]) Kobert, Pflüg. Arch. **82**.

[2]) Labbé, C. R., Soc. Biol. **55**, 201.

[3]) Kobert, a.a.O. — Dittrich, Arch. f. Path. u. exp. Pharm. **29**, 247.

[4]) Pflüger, Pflüg. Arch. **I**, 274. — Cbl. f. mediz. Wiss. **1867**, 722. Vierordt, Ztschr. f. Biol. **14**, 422. — Franz Müller, Pflüg. Arch. **103**, 541.

[5]) Bohr, Skand. Arch. III. — Kraus, Koßler, Schultz, Arch. f. exp. Patholog. u. Pharmakol. **42**, 323. — Mohr, Ztschr. f. exp. Pathol. u. Therapie **II**, 435. — Loewy, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. **1904**, 231.

[6]) Hüfner, v. Zeynek, a. a. O.

reine Oxyhämoglobinlösungen oder solche Blutlösungen, die nach der spektrophotometrischen Untersuchung nur reines Oxyhämoglobin enthielten, zu ihren Untersuchungen auswählten[1]). Wie schon mit Franz Müller ausgeführt wurde, sind es vornehmlich die Differenzen über die Sauerstoffbindung des Blutfarbstoffes in den wichtigen Arbeiten Hüfners und Bohrs, die hier eine einfache Erklärung finden. Bohr[2]), der die Lichtabsorption nur bei $\lambda = 545\,\mu$, entsprechend ε' gemessen hat, wo sich gerade die Anwesenheit des Methämoglobins am deutlichsten ausspricht, nimmt alle Werte für seine Berechnungen und findet keine Konstanz der O_2-Bindung, weder auf gleiche Lichtabsorption noch auf gleichen Eisengehalt bezogen. Hüfner[1]) dagegen hat sämtliche Hämoglobin- und Blutproben, die einen niedrigeren Quotienten als 1,57 aufweisen, unter der Begründung, daß sie sich unter Methämoglobinbildung zersetzt hätten, verworfen und findet Konstanz. Es wird auch verständlich, daß, gerade dann, wenn die Reduktion am energischsten ist, also unter Verhältnissen, die einen Sauerstoffmangel bedingen, wie hochgradiger Anämie, verminderter Luftzufuhr, eine größere Menge dissoziablen Sauerstoffs gefunden wird, als bei reichlicher Sauerstoffzufuhr und reichem Sauerstoffgehalte[3]). Aus diesem Grunde dürfen die an reinen Oxyhämoglobinlösungen gefundenen Beziehungen der Sauerstoffbindung nicht auf die im Blut des lebenden Tieres sich abspielenden Oxydationsprozesse übertragen werden.

Obgleich wohl die Menge der reduzierenden Substanzen in erster Linie von der Größe des Sauerstoffverbrauches (Arbeit, Verdauung) abhängen dürfte, müßte doch auch eine Beziehung zum Hämoglobingehalt bestehen. Sofern also die Ursachen für die Methämoglobinbildung, über die wir allerdings sehr wenig wissen, die gleichen sind, müßte diese eine geringere sein, wenn der Hämoglobingehalt vermindert ist, weil ja jetzt die Reduktion des Blutes — den Verhältnissen bei Sauerstoffmangel sich nähernd — eine energischere wird.

Ich habe daraufhin Versuche an einer Zahl von Tieren, die unter gleichen äußeren Bedingungen gehalten wurden, zusammengestellt. Viel ergeben die Tabellen nicht, immerhin zeigt sich, daß z. B. die höchsten Werte für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$, die überhaupt in einer Reihe gefunden wurden, auch dem hämoglobinärmsten Tiere angehören, daß ferner die normalen Schlachthoftiere sämtlich niedrige Werte aufweisen und daß wenigstens hier und da (z. B. siehe folgende Tab. III, 12, 15) bei dem gleichen Tiere mit der Abnahme des Hämoglobingehaltes eine Zunahme des Wertes $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ zu konstatieren ist.

---

[1]) Hüfner, v. Zeynek, a. a. O.

[2]) Bohr, a. a. O.

[3]) Bohr, Skand. Arch. III. — Paul Bert u. Viault, C. R. **94**, 807, **112**, 295, **144**, 1562.

Tabelle III.

Kalb Nr.	Hb. %	$\frac{s'}{s}$	Kalb Nr.	Dat.	Hb. %	$\frac{s'}{s}$	Kalb Nr.	Dat.	Hb. %	$\frac{s'}{s}$
				1905				1905		
Anämische Versuchstiere 1904: XIII	2,79	1,534	19	20. III.	6,84	1,593	18	30. XI. 04.	11,75	1,450
V	4,94	1,477		6. IV.	8,32	1,598		24. III.	12,26	1,514
IV	5,45	1,459	1	28. II.	7,35	1,519				
VIII	7,38	1,468		14. III.	7,63	1,517	2	30. XII. 04.	10,72	1,425
VI	8,05	1,454						13. III.	11,68	1,546
			12	3. XII. 04.	11,64	1,419				
				2. II.	10,26	1,523	11	8. II.	11,33	1,410
8 Normaltiere	10,0 bis 13,0	1,416 bis 1,473		6. IV.	7,27	1,591		1. III.	11,83	1,504
			15	30. XII. 04.	11,99	1,434				
				8. II.	11,20	1,529	10	28. I.	11,41	1,491
				8. III.	10,61	1,558		8. II.	9,24	1,501
3 junge Hunde	10,82	1,565								
	12,98	1,479	5	23. XII. 04.	13,12	1,411				
	14.37	1,505		6. IV.	12,81	1,518				

Durch diese Versuche sind alle diejenigen Schwankungen des Wertes $\frac{s'}{s}$ erklärt, welche unterhalb des Mittelwertes resp. des Extinktionsverhältnisses für reines Oxyhämoglobin liegen. Allerdings erreichen die höchsten Werte, die ich nach Selbstreduktion und Wiederarterialisierung fand, noch nicht die höchsten an frischen Blutproben beobachteten Quotienten $\frac{s'}{s}$. Es bleibt dann noch eine, wenn auch sehr geringe Zahl von recht hohen Werten über 1,60, wie sie ja auch Hüfner und v. Zeynek nicht fehlen, die auch nach diesen Versuchen unerklärt bleiben. Die Möglichkeit, daß hier vielleicht noch andere Modifikationen des Blutfarbstoffs im Sinne Bohrs vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden.

Wenn ich kurz zusammenfasse, so haben diese Versuche erwiesen, daß sicher in dem uns zur Untersuchung dienenden, frisch entnommenen Blut, höchstwahrscheinlich auch in dem im Körper kreisenden Blut nicht nur Hämoglobin und Oxyhämoglobin, sondern sehr häufig auch ein mehr oder minder großer Anteil Methämoglobin vorhanden ist. Die im Blute vorkommenden resp. nach Sauerstoffmangel oder Sauerstoffzehrung entstehenden reduzierenden Substanzen spielen bei diesem Prozeß insofern eine wichtige Rolle, als sie bei reichlicher Anwesenheit Methämoglobin (durch Reduktion zu Hämoglobin) aus dem Blut zu entfernen vermögen.

Diejenigen Mengen von Methämoglobin, welche physiologisch im Blute vorkommen, sind aber stets nur geringe; unter pathologischen Verhältnissen kann dagegen ein ganz beträchtlicher Teil des Blutfarbstoffs in Methämoglobin verwandelt werden[1]). Das Studium solcher Vergiftungen, die eine Methämoglobinbildung hervorrufen, hat es sehr wahrscheinlich gemacht, daß auch hier das Methämoglobin, wenigstens soweit es in den Blutkörperchen bleibt, wenn sich das Tier von der Vergiftung erholt, wieder in Oxyhämoglobin übergeht.

Ich kann diese Rückverwandlung von Methämoglobin in Oxyhämoglobin durch Versuche an Katzen, die mehrfach mit Anilin (ich gebe ca. 0,3 g per Kilo Körpergewicht subkutan), behandelt wurden, bestätigen. Die Methämoglobinvergiftung war nach den klinischen Symptomen jedesmal recht schwer, nach der spektrophotometrischen Untersuchung $\left(\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}\right.$ 1,23 bis 1,29) über die Hälfte des Hämoglobins in Methämoglobin verwandelt, läuft aber ab, ohne daß Methämoglobin in den Harn oder das Serum übergeht. Am Schluß von 3 bis 4 solcher Vergiftungen innerhalb 14 Tagen hat die Blutfarbstoffkonzentration solcher Tiere keine nennenswerte Veränderung erlitten, es muß also das Methämoglobin fast quantitativ in Oxyhämoglobin zurückverwandelt sein.

Offenbar liegt es am nächsten anzunehmen, daß die Umwandlung von Methämoglobin in Oxyhämoglobin nach solchen Methämoglobinvergiftungen ebenso zustande kommt wie im Reagenzglase, d. h. daß das Methämoglobin zu Hämoglobin reduziert und dann wieder zu Oxyhämoglobin oxydiert wird. Durch die Umwandlung eines großen Teiles des Hämoglobins in Methämoglobin ist ja ein Teil des Blutfarbstoffes außerstande den Sauerstofftransport im Körper auszuführen, in den Geweben herrscht Sauerstoffmangel, wie er sich in der Dyspnoe und Cyanose zu erkennen gibt, und somit sind alle Vorbedingungen für eine ausgiebige Reduktion des Blutes in den Kapillaren gegeben. Die Ansicht, daß das Methämoglobin durch Reduktion in normalen Blutfarbstoff übergeht, ist auch von mehreren Forschern schon ausgesprochen[2]) und von Kobert[3]), der diesen Reduktions-Prozeß in die Leber verlegt, sehr wahrscheinlich gemacht worden.

---

[1]) Dittrich, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 29, 247.

[2]) Zuntz und Loewy, Physiologische Grundlagen der Sauerstofftherapie im Handbuch d. Sauerstofftherapie, S. 1 u. ff. — Hayem C. R. CX, 698. — Dittrich, a. a. O.

[3]) Kobert a. a. O., und Lehrbuch der Intoxikationen.

Neuerdings hat allerdings Brat[1]) diesen Übergang auf eine Oxydation zurückführen wollen, weil es ihm nicht gelang „durch die im Blute vorkommenden reduzierenden Stoffe wie Traubenzucker, Glukuronsäure usw.“ Methämoglobin zu Hämoglobin zu reduzieren. Er sieht zwar in der Dyspnoe das Heilmittel von der Methämoglobinvergiftung, aber nicht in dem Stauerstoffmangel, sondern in der reichlicheren Sauerstoffzufuhr, (wohl um dadurch der Sauerstoff-Therapie eine theoretische Stütze zu geben), wie sie durch die dyspnoischen, übermäßigen Atembewegungen bedingt sein soll. Demgegenüber ist zu erwidern: Nur solange nicht genügend Sauerstoff im Blute ist, erfolgen solche übermäßigen Atembewegungen, diese werden wieder normal, sobald der Sauerstoff für den Bedarf des Organismus ausreicht. Die Cyanose zeigt aber, daß das nicht einmal der Fall ist, geschweige denn, daß von einem Sauerstoff-Überschuß die Rede sein kann. Andererseits zeigen ja meine Versuche, ebenso wie die älteren von Araki, Marchand usw., daß Blut — zumal stark reduziertes Blut — sehr wohl Methämoglobin zu Hämoglobin zu reduzieren vermag, und die Tierversuche erbringen den Nachweis, daß diese Reaktion höchstwahrscheinlich auch im Tierkörper vor sich gehen kann.

Im Verlauf dieser Versuche fand ich bei Kaninchen — eine Beobachtung, die unterdessen auch schon von Brat[1]) publiziert ist — nach subkutaner Injektion von Anilin in einer Menge (ca. 1,2 bis 1,5 g per Kilo Körpergewicht) die den Tod einer Katze von doppeltem Gewicht unter dem Bilde schwerster Methämoglobinvergiftung hervorrufen würde, keine spektroskopisch oder spektrophotometrisch nachweisbare Veränderung des Blutfarbstoffes.

Es treten vielmehr bei diesen Tieren als einzige Wirkung des Anilins Lähmungserscheinungen und krampfartige Zuckungen der Extremitätenmuskulatur auf.

Ich habe mich bemüht festzustellen, worauf dieses verschiedene Verhalten des Katzen- und Kaninchenblutes zurückzuführen ist. Man könnte annehmen, daß die Körperchen der Kaninchen für Anilin undurchgängig sind, sodaß es auf den Blutfarbstoff selbst nicht einwirken kann, ähnlich wie das v. Mering z. B. für Chlorate nachgewiesen hat. Nun haben aber vergleichende Untersuchungen ergeben, daß Blutkörperchenbrei von Katzen-, Kaninchen-, ebenso wie von Hunde- und Affenblut mit einem abgemessenen Volumen mit Anilin gesättigter isotonischer Kochsalzlösung verdünnt in gleicher Weise hämolysiert werden; auch hinsichtlich der Geschwindigkeit — im Brutschrank ca. 30 bis 40′ — war bei gleichen Kon-

[1]) Brat, Handbuch d. Sauerstofftherapie S. 355 ff.

zentrationen kein nennenswerter Unterschied festzustellen. Diese hämolytische Wirkung des Anilins zeigt, daß das Anilin in den Lipoiden der Blutkörperchen von Katzen wie von Kaninchen löslich ist (resp. bei dieser Konzentration des Anilins diese im Anilin), daß also das Anilin ebenso in die Blutkörperchen des Kaninchens wie der Katze eindringen kann. Daß im Tierkörper keine Hämolyse eintritt, erklärt sich daraus, daß bei unseren Tierversuchen die Konzentration des Anilins eine viel, viel geringere ist und sich hier Anilin in den Blutkörperchen löst (Verteilungssatz).

Wenn der Unterschied im Verhalten des Katzen- und Kaninchenblutes gegen Anilin nicht am Eindringen liegt, muß er fraglos auf den Blutfarbstoff selbst zurückgeführt werden. Beim weiteren Studium der Einwirkung von Anilin auf Blutfarbstoff hat sich ergeben, daß Anilin mit Hämoglobin- oder Oxyhämoglobinlösungen unter Bildung eines absolut unlöslichen ziegelroten Niederschlages reagiert, sodaß schließlich das ganze Hämoglobin in diese Modifikation übergeführt wird; es scheint, daß dies mit Katzen- und Hundeblut leichter zu erreichen ist, als mit Kaninchenblut. Dieser Befund erinnert an eine Beobachtung von K. Takayama[1]), daß Jodate auf Blutfarbstoff unter Bildung eines unlöslichen ziegelroten Körpers, den er als Jodathämoglobin bezeichnet, reagieren und daß diese Bildung von Jodathämoglobin bei Katzenblut in viel stärkerem Maße statthat, als bei Kaninchenblut.

II.

Die schon in Gemeinschaft mit Franz Müller in Angriff genommene Untersuchung der Frage, ob Eisengehalt und spektrophotometrisch gemessener Farbstoffgehalt des Blutes einander parallel gehen, ist von mir durch eine beträchtliche Zahl von Versuchen erweitert worden. Wie wir schon bei unseren ersten Untersuchungen ausgeführt haben, bedingen auch unter der Voraussetzung, daß das Hämoglobinmolekül stets die gleiche chemische Zusammensetzung und somit auch einen konstanten Eisengehalt hat, die variierenden Werte für das Extinktionskoeffizientenverhältnis $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ auch bestimmte Differenzen der Werte für die Beziehung $\frac{Fe}{\varepsilon}$ und $\frac{Fe}{\varepsilon'}$. Denn bei Verwandlung einer gewissen Menge Oxyhämoglobin in Methämoglobin wird, wie vorhin ausgeführt, ε und ε' kleiner, vornehmlich aber letzteres. Es müssen also bei niedrigeren Quotienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ geringe Zunahmen des Wertes $\frac{Fe}{\varepsilon}$, größere des Wertes $\frac{Fe}{\varepsilon'}$, umgekehrt bei höheren Quotienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ geringe Abnahmen des Wertes $\frac{Fe}{\varepsilon}$, größere des Wertes $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ gefunden werden, es variiert dem-

[1]) Beiträge zur Toxikologie und gerichtlichen Medizin, S. 2 bis 24.

nach $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ viel mehr als $\frac{Fe}{\varepsilon}$. Da nun Bohr gerade das Verhältnis $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ bestimmt hat, hatten wir, allerdings auf Grund unserer damals noch verhältnismäßig kleinen Zahl von Analysen, die Vermutung ausgesprochen, daß Bohr aus diesem Grunde die Beziehung Eisengehalt zu Lichtabsorption inkonstant gefunden hat.

Die Versuche, XVIIa, b, XVIIIa—c, XIXa, b der folgenden Tabelle IV zeigen sehr deutlich wie tatsächlich $\frac{Fe}{\varepsilon}$ und $\frac{Fe}{\varepsilon'}$, wenn Methämoglobin aus dem Blute durch die vorhin beschriebene Operation entfernt wird, also bei zunehmenden Quotienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$, kleiner werden und zwar $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ erheblich mehr als $\frac{Fe}{\varepsilon}$. Man muß also die gleichzeitig für $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ gefundenen Werte unter Berücksichtigung dieses Einflusses ebenfalls in Betracht ziehen, wenn man aus der Beziehung Eisen : Lichtabsorption einen Schluß auf den Eisengehalt des Blutfarbstoffes ziehen will.

In der Tabelle IV (Seite 18) sind unsere Untersuchungen[1]) über die Beziehung der Lichtabsorption des Blutfarbstoffes zum Eisengehalt des Blutes unter verschiedenen Bedingungen übersichtlich zusammengestellt. Betrachten wir erst einmal mit Ausschluß der Katzenversuche die Versuche Nr. I bis IVa; VI bis VIII; XIV bis XVIII; XX, welche als Normalversuche gelten dürfen, so sehen wir, daß unter gleichen äußeren Bedingungen (Tierart, Ernährung, Alter) die Werte $\frac{Fe}{\varepsilon}$ und $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ bei den einzelnen Versuchstieren nicht mehr differieren als durch Schwankungen des Extinktionskoeffizientenverhältnisses bedingt ist (z. B. III oder XVIIIc). Besonders deutlich zeigen den Parallelismus zwischen Eisengehalt und Lichtabsorption die Untersuchungen an den 3 aus einem Wurfe stammenden, gleichmäßig genährten Hunden[2]) (VI bis VIII) und die an den gesunden gleichmäßig gehaltenen und genährten Pferden (I bis IVa). Bei den Kälbern fällt III aus der Reihe heraus; dieses wurde mit einem auch sonst Schädigungen hervorrufenden Heu meliorierter Moorwiesen genährt.

---

[1]) Versuch I, II, IIIa, b, IVa, V und XIV sind in Gemeinschaft mit Franz Müller ausgeführt und schon Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1906 Suppl. mitgeteilt.

[2]) Die mir von Frau Dr. Irma Klausner-Cronheim in liebenswürdigster Weise zur Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden.

Auffälliger sind schon die Differenzen der in Versuch V, sowie in den Katzenversuchen IX bis XIII gefundenen Werte. Für die hier beobachteten Abweichungen werden uns die Versuche IVa bis f eine Erklärung geben.

Durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Professor Dr. Ostertag und des Herrn prakt. Tierarztes Hempel war ich in der Lage, an einem Pferde, welches im Hygienischen Institut der Kgl. Tierärztlichen Hochschule zu Versuchen über die sog. ansteckende Anämie der Pferde gedient hatte, eine Reihe von Blutuntersuchungen auszuführen, und zwar vor der Krankheit, während der Krankheit in verschiedenen Stadien und nach vollständiger Wiedererholung.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, für die freundliche Überlassung des Materials auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Die Krankheit, die übertragbar ist, äußert sich darin, daß unter Fiebererscheinungen ein reichliches Zugrundegehen roter Blutkörperchen stattfindet und gleichzeitig das Blut an Hämoglobin ärmer wird. Das Blutbild zeigt keine abnormen Gebilde (Normoblasten usw.). Der „Färbeindex" scheint unverändert zu bleiben.

Wir sehen nun folgendes: Das Blut des Tieres weist gesund einen Hämoglobingehalt von 15,68 % sowie einen Eisengehalt von 5,394 mg in 10 ccm auf. Unter Fiebererscheinungen tritt, wie die Versuche IVb, c, e zeigen, relativ schnell eine Abnahme des Farbstoff- und des Eisengehaltes ein. Beide sinken innerhalb 3 Wochen bis auf ca. $^2/_5$ des Normalwertes (6,45 % Hb und 2,455 mg Fe). Der Versuch IVc, der wie wir gleich sehen werden, in anderer Hinsicht interessant ist, gibt keine absoluten Werte, da die Defibrinierung mißglückt ist. Betrachten wir jetzt die Beziehung $\frac{Fe}{\varepsilon}$ und $\frac{Fe}{\varepsilon'}$, so sehen wir, daß in den ersten Tagen des Blutkörperchenzerfalls sowohl $\frac{Fe}{\varepsilon}$ wie $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ viel größer als normal ist, um im weiteren Verlauf stetig abzusinken. Die Werte in IVc scheinen auf den ersten Blick aus dieser Reihe herauszufallen. Doch sind die zu niedrigen Werte für $\frac{Fe}{\varepsilon}$ und vornehmlich für $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ darauf zurückzuführen, daß hier der Quotient $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ zugenommen und somit die absoluten Werte der Lichtabsorption größer geworden sind (vergl. hierzu VII und VIII). Die Bedeutung dieser Änderung des Quotienten $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ vermag ich nicht zu erklären. Dagegen glaube ich die Änderung in der Beziehung $\frac{Fe}{\varepsilon}$ und $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ folgendermaßen deuten zu sollen: Unter der Wirkung des Krankheitserregers findet ein Zerfall eisenhaltigen Blutfarbstoffmaterials statt. Dieser Zerfall geht

Tabelle

Versuch Nr.	Tier	Status	Dat.	Verdünnung	Im Mittel von je 10 Ablesungen φ	φ'
I b.	Pferd VII	Gesund	12. IV.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	63,86°	72,16°
I a.				0,6216 Blut : 99,822 Soda	55,10°	63,71°
II.	Pferd VIII	Gesund	23. IV.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	64,35°	72,54°
III a.	Pferd III	(Nach 4 Fieberperioden)	7. IV.	2,380 Lösung : 100,0 Soda	64,05°	69,88°
III b.				2,373 Lösung : 100,0 Soda	62,83°	69,03°
III c.		Gesund	14. VI.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	58,40°	66,54°
IV a.	Pferd VI	Gesund	10. IV.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	64,51°	72,20°
IV b.		Erkrankt 20. IV. Fieber 40° C.	23. IV.	do.	57,26°	65,09°
IV c.		Abnahme des Fiebers	28. IV.	do.	55,42°	65,02°
IV d.		Das Tier erholt sich; Abnahme des Hb. und der Erythrocyten hält an	7. V.	1,8650 Blut : 99,822 Soda	50,60°	58,21°
IV e.			10. V.	do.	63,17°	71,25°
IV f.		Wieder gesundet	3. VII.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	61,61°	70,18°
V.	Hund	Nach wiederholten Aderlässen	24. VIII.	2,7974 Blut : 150,0 Soda	65,13°	74,14°
VI.	Hündchen I	Aus einem Wurf; 4 Monat alt. Milchnahrung	2. V.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	57,74°	67,13°
VII.	Hündchen II		3. V.	do.	52,89°	62,50°
VIII.	Hündchen III		6. V.	do.	55,64°	64,58°
IX.	Katze I	Vorher schon kleine Blutentnahme	7. IV.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	65,32°	74,06°
X.		Am 7. IV. Aderlaß!	12. IV.	1,865 Blut : 99,822 Soda	61,48°	69,75°
XI.	Katze II (kleine)	Kein Aderlaß	21. IV.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	57,91°	66,66°

IV.

ε (auf 1 : 100,000 berechnet)	ε' (auf 1 : 100,000 berechnet)	$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	Eisenbestimmungen gefunden in 10,000 ccm: mg Fe	Eisenbestimmungen gefunden in 10,000 ccm: im Mittel	$\frac{Fe}{\varepsilon}$	$\frac{Fe}{\varepsilon'}$	Bemerkungen
0,76218	1,10000	1,443	5,131	5,131	6727	4660	
0,77876	1,13584	1,459			6582	4502	
0,77858	1,11935	1,438	5,299 5,137	5,218	6700	4660	
0,30163	0,38945	1,291	2,126 2,087	2,107	6975	5403	Sodablutlösung. Blut ursprünglich spektro-photom. 13,97 % Hb.
0,29954	0,39266	1,311			7026	5359	
0,60130	0,85640	1,424	4,119 3,948	4,034	6709	4710	
0,78397	1,10200	1,406	5,379 5,408	5,394	6878	4892	15,68 % Hb.
0,57153	0,80398	1,407	4,750 4,523	4,637	8118	5781	11,43 % Hb.
0,52668	0,80157	1,522	3,974	3,974	7545	4958	Serum Fe-frei. 10,53 % Hb.
0,18441	0,26002	1,410	1,510 1,489 1,412	1,470	7956	5642	Schlecht defibriniert; Fibrin stark Hb-haltig.
0,32274	0,46043	1,427	2,451 2,482 2,431	2,455	7605	5331	Serum Fe-frei. 6,45 % Hb.
0,69128	1,00568	1,455	3,995 3,991	3,993	5776	8971	13,83 % Hb.
0,40341	0,60416	1,498	2,564 2,550	2,557	6340	4229	
0,58377	0,88080	1,505	4,217 4,339	4,278	7328	4868	6,9 Mill. Erythrocyten im ccm.
0,45909	0,71850	1,565	3,341 3,204	3,273	7129	4555	6,2 Mill. Erythrocyten im ccm.
0,53186	0,78638	1,479	3,952 3,775	3,864	7263	4914	
0,81205	1,20168	1,480	5,135 5,376	5,264	6483	4382	
0,34368	0,49327	1,435	2,134 2,042	2,088	6075	4233	
0,58814	0,86090	1,464	4,339 4,331 4,311	4,327	7356	5025	

Tab. IV

Versuch Nr.	Tier	Status	Dat.	Verdünnung	Im Mittel von je 10 Ablesungen φ	φ'
XII.	Katze III (große)	Kein Aderlaß	19. IV.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	64,91°	74,28°
XIII.		Am 19. IV. Aderlaß; vor der Blutentnahme etwas Äther!	14. V.	do.	63,24°	70,89°
XIV.	Rind	Normal	27. VIII.	1,865 Blutsodalsg. : 100,0 Soda	62,65°	71,88°
XV.	Kalb V		21. VI.	0,9325 Blut : 99,822 Soda	53,78°	61,33°
XVI.	Kalb II		23. VI.	do.	51,45°	58,46°
XVII a.	Kalb IV		21. VI.	do.	59,98°	67,93°
XVII b.		do., selbstreduziert bis	13. VII.	do.	60,51°	69,20°
XVIII a.	Kalb IV		2. VII.	do.	58,44°	67,04°
XVIII b.		do., selbstreduziert bis	26. VII.	do.	58,73°	67,78°
XVIII c.		do., selbstreduziert bis	30. VII.	do.	59,12°	68,74°
XIX a.	Kalb III		3. VII.	do.	56,48°	64,45°
XIX b.		do., selbstreduziert bis	22. VII.	do.	57,08°	66,18°
XX a.	Kalb VI		5. VII.	do.	57,25°	66,52°
XX b.		do., selbstreduziert bis	25. VII.	do.	57,78°	66,73°
XX c.		do., selbstreduziert bis	1. VIII.	do.	57,87°	67,13°

aber so schnell vor sich, daß nicht alle Reste eisenhaltiger Zerfallsprodukte sofort aus dem Blut eliminiert werden können, vielleicht weil sie in den noch zirkulierenden, für Fe-Salze impermeablen, Erythrocyten eingeschlossen bleiben. Diese Reste verschwinden dann aber allmählich trotz fortschreitenden Farbstoffzerfalls. Derartiges „Schlackeneisen" oder „Zerfallseisen" ist direkt im Blute Anämischer nachgewiesen worden[1]). Versuch Vf gibt schließlich noch eine Blutuntersuchung 2 Monate später, nachdem sich das

[1]) P. Ehrlich-Lazarus, „Die Anämieen" Nothnagels Handb.

(Fortsetzung).

ε auf 1 : 100,000 berechnet	ε'	$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	Eisenbestimmungen gefunden in 10000 ccm mg Fe	im Mittel	$\frac{Fe}{\varepsilon}$	$\frac{Fe}{\varepsilon'}$	Bemerkungen
0,79772	1,21420	1,522	5,490	5,490	6882	4521	
0,72507	1,03827	1,399	4,722 4,573	4,648	6410	4477	
0,36223	0,54397	1,502	2,269 2,233	2,251	6216	4139	
0,48922	0,68290	1,396	3,010	3,010	6152	4407	
0,43969	0,60360	1,373	2,757 2,848	2,803	6374	4643	
0,64384	0,88944	1,414	3,910 3,802	3,893	6046	4377	Mit Kleeheu gefüttert.
0,65900	0,96268	1,461	3,966		5907	4044	
0,59510	0,87536	1,471			5893	4006	
0,60978	0,90432	1,483	3,507	3,507	5751	3878	
0,62013	0,94328	1,521			5660	3718	
0,55213	0,78193	1,416	3,059 3,080	3,091	5598	3953	Mit Meliorationsheu gefüttert.
0,56701	0,84304	1,487	3,135		5451	3666	
0,57127	0,85566	1,498	3,390 3,475	3,433	6009	4012	
0,58477	0,86354	1,477			5871	3976	
0,58703	0,87890	1,497			5848	3906	

Tier von der Erkrankung erholt und seinen Blutkörperchen- und Hämoglobinbestand z. T. wieder regeneriert hat. Jetzt finden wir aber erheblich niedrigere Werte für $\frac{Fe}{\varepsilon}$ ebenso wie für $\frac{Fe}{\varepsilon'}$. Die geringe Zunahme des Quotienten von 1,410 i. M. auf 1,455 ist natürlich dafür nicht verantwortlich zu machen. Vielmehr ist jetzt, wo nach dem ausgedehnten Blutverlust eine teilweise Regeneration stattgefunden hat, im Blute weniger Eisen auf die gleiche spektrophotometrisch gemessene Farbstoffmenge enthalten.

Und diese Feststellung erlaubt uns nun auch eine Deutung der Differenzen der Versuche VI und X bis XIV. Bei den großen Tieren, Pferden, Rindern und Kälbern haben die zu früheren Versuchen hie und da an ihnen vorgenommenen Aderlässe keine Bedeutung. Der Verlust von 50 bis 100 ccm Blut spielt absolut keine Rolle für ein Tier von mehreren Zentnern. Die 3 jungen Hunde waren sorgsam aufgezogen und hatten bis zu ihrem durch Entbluten bewirkten Tode niemals einen Blutverlust erlitten. Hier also Konstanz!

Anders bei den kleineren Tieren, insbesondere den Katzen. Bei diesen Tieren von ca. 3000 g Gewicht, also einem Blutgehalt von ca. 250 ccm bedeutet ein Aderlaß von 50 bis 100 ccm einen ganz erheblichen Blutverlust (wie Versuch IX und X zeigen über die Hälfte des Hb!). Er muß dieselben Wirkungen zeitigen wie die Erkrankung des Pferdes, d. h. wir müssen nach ausgedehnten Aderlässen und Wiedererholung einen geringeren Fe-Gehalt auf gleichen Farbstoffgehalt erwarten. Und in diesem Sinne erklären sich die gefundenen Differenzen in den Werten für $\frac{Fe}{\varepsilon'}$ und $\frac{Fe}{\varepsilon}$ bei den verschiedenen Tieren und bei demselben Tiere zu verschiedenen Zeiten. Dem Hund in Versuch VI waren zu verschiedenen Malen vorher größere Blutproben entnommen worden. Die Katzenversuche bedürfen nach dem Gesagten und der Tabelle keiner näheren Erläuterung.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß vielleicht auch das Alter der Tiere mitzusprechen scheint. Die drei jungen Hunde haben einen übereinstimmend hohen Eisengehalt des Blutes; die im Protokoll als „klein" geführte junge Katze II hat ebenfalls einen etwas höheren Eisengehalt, als die als „groß" bezeichnete, ausgewachsene Katze III.

Vergleichende Untersuchungen über Färbekraft und Eisengehalt des Blutes sind schon früher verschiedentlich vorgenommen worden. Die ausführlichste Arbeit, welche sich fast ausschließlich mit diesem Thema befaßt, stammt von Rosin und Jellinek[1]), welche an einem sehr großen normalen und pathologischen Material für Menschenblut feststellen wollen, daß zwischen Eisengehalt und Färbekraft des Blutes keine regelmäßigen Beziehungen bestehen. Die sehr großen Abweichungen, die sie gefunden haben, sind absolut regellos; sie betragen in den verschiedenen Fällen und Krank-

[1]) Rosin u. Jellinek, Ztschr. f. klin. Mediz. **39**, 109—141. Jellinek, Wien. klin. Wochenschr. **1898**, Nr. 33/34.

heitsgruppen bei derselben Versuchsperson in wenigen Tagen bis zu 20 und 30% vom Werte. Das Hämoglobin wurde hierbei mit dem Fleischl-Miescherschen Hämometer, das Eisen aber mit dem Jollesschen „Ferrometer“[1]) bestimmt. Dieser unter vielen Kautelen klinisch zur schätzungsweisen Bestimmung vielleicht brauchbare Apparat[2]) kann wohl auf chemische Exaktheit keinen Anspruch erheben[3]). Da nun verschiedene andere Forscher festgestellt haben, daß „bei richtiger Ausführung“ Ferrometer und Hämometer-Zahl parallel gehen[4]), bin ich wohl mit Recht geneigt, die regellosen Schwankungen, die Rosin und Jellinek gefunden haben, auf Rechnung ihrer unzureichenden Methodik zu setzen.

Aus Untersuchungen von Mayer[5]), der in einer Reihe von Blutproben das Eisen wie ich nach Neumann bestimmte und gleichzeitig das Hämoglobin mit dem Fleischl-Miescher, geht hervor, daß im normalen Menschenblut Eisengehalt und Färbekraft parallel gehen. Im anämischen Blut dagegen ist die Färbekraft oft stärker herabgesetzt als der Eisengehalt. Aus drei Analysen anämischen Blutes von Erben[6])(Färbekraft spektrophotometrisch, Eisen chemisch) berechnet sich, daß zweimal Eisen und Hämoglobin ganz gleichmäßig vermindert sind, bei dem dritten Fall fand sich auf die gleiche Hämoglobin-Menge bezogen eine die Fehlergrenze eben überschreitende Menge Eisen mehr („anderer Provenienz“). Mit diesen Befunden lassen sich die meinen gut in Einklang bringen: auch ich fand bei dem anämischen Pferd auf der Höhe der Erkrankung, also in der Periode des Blutfarbstoffzerfalles eine schnellere Abnahme des Farbstoff- als des Eisengehaltes, während nachher ein Ausgleich eintritt. Man darf annehmen, daß bei dem dritten Fall von Erben, sowie denjenigen Fällen von Mayer, welche stärkere Abnahme der Färbekraft als des Eisengehaltes zeigten, die Erkrankung noch frischer war. Ein etwas abweichen-

---

[1]) Jolles Deutsche mediz. Wochenschr. **1897**, Nr. 10, **1898**, Nr. 7. Pflügers Arch. 45. Sitz-Ber. Akad. Wien 105 II b.

[2]) Hladik, Wien. klin. Wochenschr. **1898**, 74.

[3]) Schwenkenbecher, D. Arch. f. klin. Med. **75**, 480—486.

[4]) Jolles, D. Arch. f. klin. Mediz. **76**, 501—504. — Bötzelen, Münch. med. Wochenschr. **49**, 366/67. — Bathias, Henri, Thèse de Lyon 1903 nach Maly **33**, 187. — Altmann, Münch. med. Wochenschr. **1904**, 1783/84. — Mitulescu, Ztschr. f. klin. Mediz. **52**, 187—191.

[5]) Mayer, A., Ztschr. f. klin. Mediz. **49**, 475/81.

[6]) Erben, Ztschr. f. klin. Mediz. **47**, 302/320.

des Ergebnis lieferten Untersuchungen von Biernacki[1]), der auch bei Anämien hohen Grades einen trotz stark verminderten Hämoglobingehaltes kaum herabgesetzten Eisengehalt des Blutes sah und beträchtliche Mengen von Eisenverbindungen in den Blutkörperchen gefunden haben will, die nicht Hämoglobin waren. Vielleicht handelt es sich bei diesem von Erben[2]) bezweifelten Befund um ganz frische Fälle, bei denen das „Zerfallseisen" noch größtenteils in den Blutkörperchen eingeschlossen war.

Es fragt sich nun, ob diese vergleichenden Untersuchungen über den Farbstoffgehalt und den Eisengehalt des Blutes einen Rückschluß auf den Eisengehalt des Blutfarbstoffes zulassen. Von verschiedenen Seiten ist mehrfach darauf hingewiesen worden, daß im Blut außer dem Hämoglobin eisenhaltige Bestandteile vorkommen können[3])[4]). Daß im Serum kein Fe enthalten ist, ist verschiedentlich festgestellt worden[5]); ich habe auch in dem Serum des untersuchten anämischen Pferdes Eisen in quantitativ bestimmbarer Menge (Neumannsche Methode) nicht nachweisen können. Dagegen hat Häusermann[6]) im Plasma und zwar im Fibrin Eisen gefunden, in 100 g Plasma ca. 1 mg. Vorausgesetzt, daß dieses Eisen wirklich dem Fibrin und nicht trotz sorgfältigen Auswaschens zurückgehaltenen Resten von Hämoglobin angehört, könnte diese Eisenmenge aber bei meinen Resultaten kaum einen Ausschlag geben. Von anderen Autoren werden in den Leukozyten und in den Blutplättchen eisenhaltige Komplexe angenommen, so daß Kraus[7]) z. B. für krankes Blut keine Konstanz zwischen Eisengehalt und Lichtabsorption erwarten zu dürfen glaubt. v. Seiler und Freund[8]) wollen im Blut Chlorotischer ein eisenhaltiges Nukleoproteid, einen Farbstoff (Hämatinogen), der nicht Hämoglobin ist, gefunden haben. Alle diese Befunde scheinen aber für meine Fälle ohne Belang zu sein, zumal z. B. eine Hyperleukocytose nicht vorlag.

---

[1]) Biernacki, Ztschr. f. klin. Mediz. **24**, 460—511.
[2]) Erben, a. a. O.
[3]) Rosin u. Jellinek, a. a. O.
[4]) Kraus, Koßler, Schulz, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **42**, 323.
[5]) v. Bunge, Biernacki, a. a. O.
[6]) Häusermann, Ztschr. f. physiol. Chemie **26**, 436/37.
[7]) Kraus, Koßler, Schulz, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **42**, 323.
[8]) v. Seiler, Btrg. z. Geburtshülfe u. Gynäkologie. — Freund, Wien. klin. Wochenschr. **1903**, Nr. 27.

Demnach möchte ich den Befund, daß sich nach größeren Blutverlusten auf eine gleiche Farbstoffmenge bezogen ein beträchtlich geringerer Eisengehalt im Blute findet (vergl. vornehmlich Versuch Va—f) so deuten, daß sich bei der Regeneration ein eisenärmerer Farbstoff gebildet hat.

Dieser Nachweis ist sogar vielleicht überzeugender, als wenn es gelänge, vor und nach Aderlässen den Blutfarbstoff selbst mit verschiedenem Eisengehalt darzustellen (Bohr), da es ja mit den heutigen Darstellungs-Methoden des kristallisierten Blutfarbstoffes noch nicht gelungen ist, übereinstimmende Analysenzahlen zu erhalten [1].

Nach meinen Untersuchungen stellt dagegen der Eisengehalt des normalen Blutfarbstoffes, aber nur unter gleichen äußeren Bedingungen (Tierart, Ernährung, Alter), eine konstante Größe dar.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Zuntz für das lebhafte Interesse, das er wie stets meiner Arbeit entgegengebracht hat, und für zahlreiche Anregungen und Ratschläge meinen wärmsten Dank auszusprechen.

---

[1]) Vergl. auch Abderhalden, Ztschr. f. physiol. Chem. **87**, 184; Lehrbuch 595 ff.

Über das Vorkommen von Indol im menschlichen Mageninhalt.

Von

H. Strauß, Berlin.

(Eingegangen am 18. Dezember 1906.)

Eine in Heft 5 und 7 des ersten Bandes dieser Zeitschrift erschienene Mitteilung von Albu und Neuberg über das Vorkommen von Indol im Mageninhalt bei einem Fall von Carcinoma ventriculi gibt mir Veranlassung, auf einen Indol-Befund im menschlischen Mageninhalt hinzuweisen, über den ich selbst vor zehn Jahren in der Berl. klin. Wochenschrift[1]) berichtet habe, weil das Vorkommen von Indol im menschlischen Mageninhalt ein überaus seltenes ist, und weil die Bedingungen, unter welchen ich selbst die Anwesenheit von Indol im menschlischen Mageninhalt nachweisen konnte, auch in meinem Falle recht eigenartige waren. Es handelte sich um einen Fall von Darmstenose, die vorübergehend Ileusartige Exacerbationen mit Erbrechen von stinkendem Mageninhalt gezeigt hatte. In dem betreffenden Mageninhalt waren weder makroskopisch noch mikroskopisch Fäkalbestandteile nachzuweisen und es fehlten auch Zeichen einer chronischen Stauung des Mageninhalts wie Hefe in Sprossung oder Sarcine. In dem während der Ileusartigen Anfälle erbrochenen Mageninhalt konnte Schwefelwasserstoff und mittels der Nitritreaction Indol nachgewiesen werden. Die mikroskopische Untersuchung des Mageninhalts ergab eine Reihe kleiner stäbchenförmiger Bazillen, sowie einzelne lange fadenförmige Bazillen. In Kultur wuchsen auf Gelatine und Agar Colibazillen. die durch ihre fast völlige

---

[1]) H. Strauß, Berl. klin. Wochenschrift **1896**, Nr. 18.

Bewegungslosigkeit im hängenden Tropfen, ihr negatives Verhalten gegen die Gram'sche Färbung, durch Gasbildung in Traubenzuckerbouillon und durch Säuerung und Gerinnung von Milch identifiziert worden waren. Diese Bakterien zeigten in anaërober Kultur intensive Schwefelwasserstoff- und starke Indolreaktion. Letzteres war auch bei Züchtung in Peptonwasser zu konstatieren. Die langen Bakterien, die ich in Traubenzuckermagensaftbouillon weiter gezüchtet hatte, zeigten auf saurem Milch-Serumagar und auf Traubenzuckermagensaftagar dieselben Kolonien, wie ich sie bei meiner ersten Züchtung dieser Bakterienart beschrieben hatte[1]). Aus hier nicht zu wiederholenden Gründen habe ich die Schwefelwasserstoff- und Indolbildung in meinem Falle auf die Wirkung von Baeterium coli zurückgeführt.

Da es mir seither trotz mehrfachen Suchens nicht wieder gelungen ist, Indol im Mageninhalt nachzuweisen, und da meines Wissens auch von anderer Seite ein solcher Befund bisher nicht erhoben wurde, so scheint mir der Vergleich der Bedingungen, unter welchen in meinem Falle und in demjenigen von Albu und Neuberg Indol nachgewiesen werden konnte, von einem gewissen Interesse. Für meinen Fall hatte ich s. Zt. die Auffassung geäußert, daß infolge einer vorübergehenden Verätrkung der Darmstenose ein temporärer massenhafter Übertritt von Bacterium coli in den Magen stattgefunden haben dürfte, der unter besonderen Bedingungen zur Erzeugung von Schwefelwasserstoff und Indol geführt haben mag.

Was solche begünstigende Bedingungen betrifft, so habe ich schon früher eine gewisse Kohlehydratarmut des Mageninhalts erwähnt, und ich habe auch bei weiterer Verfolgung der Frage[2]) darauf hingewiesen, daß dieses Moment zwar nicht eine absolut notwendige Vorbedingung der Schwefelwasserstoffbildung darstellt, daß es dieselbe aber doch mehr oder weniger zu begünstigen vermag. Bei Magencarcinomen habe ich selbst — wie ich in der Senator-Festschrift erwähnt habe — stinkende Eiweißfäulnis mit Schwefelwasserstoffbildung bisher nur bei Motilitätsstörungen und auch nur dann gefunden, wenn in den Magen ergossenes Blut

---

[1]) H. Strauß, Ztschr. f. klin. Med. 28. 1895.

[2]) Vgl. H. Strauß, Beitrag zur Frage der gastrointestinalen Autointoxikationen, Senator-Festschrift, Berlin, Hirschwald, 1904.

faulte, und ich habe weiterhin, wie ich an der gleichen Stelle ausgeführt habe, auch den Eindruck gewonnen, daß die Indicanurie der Fälle von Magencarcinom mehr oder weniger vom Vorhandensein oder Fehlen von Blutbeimengungen zum Mageninhalt abhängt. v. Koziczkowsky[1]) hat dann auf meine Veranlassung noch weitere Untersuchungen über diese Frage angestellt. Mit Rücksicht hierauf scheint mir die Angabe von Albu und Neuberg einer besonderen Beachtung wert, daß in dem von ihnen untersuchten Mageninhalt „der positive Ausfall der Guajak- und Aloinprobe auf einen Blutgehalt hinwies.“ Sodann ist es aber auch von Interesse, daß in meiner Beobachtung ebenso wie in derjenigen von Albu und Neuberg eine ausgeprägte Subacidität des Mageninhalts bestand, die sich ihrerseits für mehr oder weniger lange Zeit mit einer motorischen Insufficienz kombiniert hatte. Es scheint mir dies deshalb von einem gewissen Interesse, weil ich in mehr als einem halben Dutzend von Mageninhalten, welche von Fällen von motorischer Insufficienz mit gut erhaltener Sekretion stammten, niemals Indol habe nachweisen können, während ich in einigen — allerdings nicht in allen hierauf untersuchten — Fällen der genannten Gruppe größere Werte für Ammoniak[2]) vorfand, als ich sie seiner Zeit bei motorisch leistungsfähigen Mägen habe feststellen können. Wenn sich Indol auch weiterhin nur in subaciden Inhalten finden sollte, so wäre hier ein interessanter Gegensatz zu den Bedingungen gegeben, unter welchen die Schwefelwasserstoffbildung (und wie es scheint, gelegentlich auch eine microparasitäre Ammoniakbildung) zu verlaufen pflegt. Deshalb ist die Frage der Indolbildung im menschlischen Magen an sich und weiterhin im Zusammenhalt einerseits mit der Seltenheit des Schwefelwasserstoffbefundes bei blutfreiem stagnierendem subacidem Mageninhalt, anderseits mit der Frage, warum in meinem Falle, (in welchem kein Grund zur Annahme eines Carcinoms erlag), Schwefelwasserstoff und Indol nebeneinander vorkamen, während in dem Falle von Albu und Neuberg das Indol neben der Milchsäure am Schluß der alleinigen oder mindestens überwiegenden Gegenwart von Indol Platz gemacht hat, (im Anfang war auch hier gleich-

---

[1]) v. Koziczkowsky, Ztschr. f. klin. Med. **57**, Heft 5 u. 6.

[2]) H. Strauß, Berl. klin. Wochenschrift **1898**, Nr. 17, Mitteilungen aus den Grenzgebieten der Medizin und Chirurgie, **12**, 1903, Nr. 1 und Senator-Festschrift (l. c.).

zeitig Schwefelwasserstoff vorhanden, dessen Menge allmählich abnahm) noch weiterer gründlicher Erforschung bedürftig. Bei der Seltenheit des Befundes dürfte aber jeder einzelne Beitrag von Wert sein, wenn er zur Beurteilung der Frage tatsächliches Beobachtungsmaterial liefert und ich habe mich deshalb sowie aus dem Grunde, daß ich meine eigene Beobachtung nur in dem jüngst erschienenen v. Noorden'schen Handbuch, sonst aber in der Literatur der letzten 10 Jahre nirgends erwähnt fand, zu einem Hinweis auf dieselbe und auf meine weiteren inzwischen gemachten hierhergehörigen Beobachtungen veranlaßt gefühlt.

Berichtigung.

Von

Ivar Bang.

In meiner Abhandlung in Band II dieser Zeitschrift „Zur Methodik der Zuckerbestimmung“ sind — ohne mein Versehen — die zwei Textfiguren S. 285 verwechselt worden. In Fig. I ist der Kupferverbrauch pro mg Zucker dargestellt, in Fig. II die totale Reduktion.

Auf derselben Seite kommt auch ein sehr störender Druckfehler vor. Linie 11 von unten steht Selbstreduktion, soll heißen Reduktion.

Zur Kenntnis des Glykokollabbaus bei den schweren Ernährungsstörungen des Säuglings.

Von

Ludwig F. Meyer und **Hans Rietschel.**

(Aus dem städtischen Kinderasyl und dem Laboratorium der Kgl. Kinderklinik zu Berlin.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1906.)

Die Lehre der Ernährungsstörungen des Säuglings hat durch die Erforschung der intermediären Stoffwechselvorgänge im letzten Jahrzehnt erfreuliche Fortschritte gezeitigt. Und wenn wir auch heute im Beginn dieser Forschungsrichtung noch keinen klaren Überblick über die sich intermediär abspielenden Prozesse haben können, so sind doch bereits wichtige Abweichungen vom Normalen bei dem Abbau von Nährstoffen ermittelt worden. Wir meinen die Störungen im Kohlehydratstoffwechsel, die bei jeder schweren Intoxikation (Enterokatarrh) zur Laktosurie bezw. Galaktosurie führen[1]), wir meinen ferner die Acidose[2]), die uns eine Störung im Fettabbau anzeigt. So gut wie gar nicht orientiert sind wir aber über den Verlauf und eine eventuelle Störung des Stoffwechsels der Eiweißubstanzen bei jener Erkrankung des Säuglings.

Wir wissen heute, daß das gesamte Eiweiß, das per os vom Menschen aufgenommen wird, im Magendarmkanal in seine Bruchstücken gespalten wird, um dann vom Körper entweder als Körpereiweiß retiniert oder in der Form von Harnstoff, Ammoniak usw. ausgeschieden zu werden. Dies gilt ceteris paribus genau so für den

---

[1]) Langstein und Steinitz, Hofmeisters Beiträge **7**, H. 12, S. 575.

[2]) L. F. Meyer und Langstein, Jahrb. f. Kinderheilk. **63**, 30.

Säugling wie für den Erwachsenen. Wenn auch Pfaundler[1]) für den Prozentanteil von Harnstoff im Urin beim Säugling wesentlich niedrigere Werte als beim Erwachsenen fand, so ist doch bei Nachprüfung durch Keller[2]), Camerer[3]) und Langstein-Steinitz[4]) andererseits erwiesen, daß auch beim Säugling das Prozentualverhältnis des Harnstoffs zum Gesamtstickstoff sich wie beim Erwachsenen verhält, und zwar ca. 60—80⁰/₀ beträgt, eine Tatsache, die, wie wir sehen werden, auch durch unsere Versuche eine neue Bestätigung findet. Eine weitere Differenz von den bei Erwachsenen festgestellten Werten fand Pfaundler beim Säugling darin, daß ein beträchtlicherer Anteil des ausgeschiedenen Stickstoffs auf die Aminosäurenfraktion fiel. Im übrigen kennen wir keinerlei Abweichungen, die die stickstoffhaltigen Endprodukte im Harn des Säuglings von denen im Harn des Erwachsenen unterscheiden.

Der Körper hat sowohl beim Erwachsenen als auch beim Säugling die Fähigkeit, zugeführtes Eiweiß völlig zu verbrennen, und zum größten Teil in Harnstoff überzuführen. „Die Fähigkeit“, so schreibt Salkowski[5]) im Jahre 1880, „Eiweiß, welches vom Darmkanal aus in die Säftemasse gelangt, ja selbst direkt in die Blutbahn eingeführtes Eiweiß in bestimmte Endprodukte aufzulösen, erscheint, wenigstens unter normalen Verhältnissen, eine unbegrenzte. Auch bei der reichlichen Aufnahme von Eiweiß in den Darm entgeht nichts davon dem zersetzenden Einfluß des Körpers, gelangt keine Spur davon in den Harn.“ Allerdings haben einige Autoren, Ascoli[6]), Kaliski-Weigert[7]) u. a. seitdem in extremen Fällen von Eiweißüberfütterung gefunden, daß Spuren von Albumin im Urin ausgeschieden wurden. Die biologische Forschung hat uns ermöglicht den Weg zu verfolgen, den dieses Eiweiß bis zu seiner Ausscheidung nimmt. Und zwar gelang es Ganghofner und Langer[8]) mit Hilfe der Präzipitinreaktion nachzuweisen, daß in derartigen Fällen das dem Körper fremde

---

1) Jahrb. f. Kinderheilk. **54**, 247.
2) Die Malzsuppe, Monographie. Verlag von Fischer **1898**.
3) Ztschr. f. Biologie **48**, 13.
4) Jahrb. f. Kinderheilk. **61**, 94.
5) Ztschr. f. physiol. Chem. **4**, 100.
6) Münchner med. Wochenschr. **1902**, 398.
7) Jahrb. f. Kinderheilk. **61**, 85.
8) Münchner med. Wochenschr. **1904**, Nr. 34.

Eiweiß in der Blutbahn kreist. Freilich haben neuere Untersuchungen (Obermeyer und Pick[1]), Friedemann und Isaac[2]) den Wert dieser Methode als Beweis der Gegenwart von unverändertem Eiweiß angezweifelt, indem sie nachweisen konnten, daß bei gewissen tiefgehenden Spaltungsprodukten des Eiweißes noch die Präzipitinreaktion positiv verläuft.

Wollen wir mit chemisch-analytischen Methoden uns einen Einblick in den Abbau des Eiweißmoleküls verschaffen, dann sind wir gezwungen, aus den unendlich vielen Komplexen, die das Gesamteiweißmolekül ausmachen, eine Verbindung herauszuschälen, und deren Abbau zu verfolgen.

Wir wählten eine Aminosäure, das Glykokoll, von dem wir mit Sicherheit wissen, daß es im Organismus quantitativ zu Harnstoff verbrannt wird, und das uns außerdem die Möglichkeit der leichten Isolation bietet, falls unverbranntes Glykokoll zur Ausscheidung in beträchtlichen Mengen gelangt. Daß Glykokoll, per os eingegeben, zu Harnstoff verbrannt und ausgeschieden wird, haben Nencki und Schultzen[3]) und Salkowski[4]) bewiesen. Niemals konnten diese Autoren Glykokoll nach Eingabe dieser Aminosäure per os im Harn wiederfinden, ebenso wenig wie das später von Stolte[5]) und Abderhalden und Bergell[6]) nachgewiesen werden konnte, die Tieren Glykokoll einspritzten. Nur bei Überschreitung der eingegebenen Dosis bis zu exorbitant hohen Werten (25 g an einen Hund verfüttert oder in einem Versuch von Salaskin und Kowalewsky[7]) mit 17 g Eingabe) traten geringe Mengen dieser Aminosäure in den Harn über.

Ebenso wie vom Glykokoll wissen wir von anderen Aminosäuren (Alanin, Leucin, Tyrosin), daß sie, in den Organismus eingeführt, zum größten Teil verbrannt werden. Freilich ist bei allen diesen Säuren nicht sichergestellt, daß ihre Endprodukte Harnstoff sind. Z. B. wissen wir durch Stolte[8]), daß nach subkutaner

---

1) Wien. klin. Wochenschr. **1906**, Nr. 12.
2) Arch. f. experim. Path. und Ther. **2**.
3) Ztschr. f. Biologie **8**, 124.
4) A. a. O.
5) Hofmeisters Beitr. **5**, 15.
6) Ztschr. f. physiol. Chem. **39**, 9.
7) Ztschr. f. physiol. Chem. **42**, 412.
8) A. a. O.

Einführung geringer Mengen von Tyrosin und Phenylalanin keine Harnstoffvermehrung resultiert. Nach allen bisher vorliegenden Versuchen werden also sowohl per os als auch subkutan eingeführte Aminosäuren verbrannt.

Inwieweit diese Verbrennungsfähigkeit auch beim erkrankten Organismus erhalten ist, war in den letzten Jahren der Gegenstand mehrfacher Bearbeitung. Man hat in der Tat bei bestimmten Stoffwechselerkrankungen Störungen in der Verbrennung eruiert. Wir wissen, daß der Hungerzustand, wir wissen, daß der Diabetes mellitus die Verbrennungsfähigkeit den Aminosäuren gegenüber herabsetze und dieselben in vermehrter Menge zur Ausscheidung bringen. Auch bei der Gicht sollen Aminosäuren vermehrt ausgeschieden werden, indessen sind die Resultate dieser Forschung noch nicht einwandfrei und die Diskussion über diese Frage ist noch nicht geschlossen. Man ist geneigt, die Ursache der Stoffwechselstörung in einer herabgeminderten Oxydationsmöglichkeit im intermediären Stoffwechsel zu suchen; dafür sprechen die interessanten Versuche von Löwy[1]). Von Löwy konnte nämlich festgestellt werden, daß die Ausscheidung der Aminosäuren wesentlich größer wird, sobald der Mensch sich in Höhen begibt, wo ein stark verminderter Luftdruck stattfindet. In jenen Höhenlagen antwortet der Organismus auf den verminderten Luftdruck, wie durch die Zuntzsche Schule mit Sicherheit festgestellt wurde, durch eine Vermehrung seiner Blutkörperchenzahl, ohne daß diese Reaktion des Organismus den normalen Ablauf der Oxydation zuwege bringt. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei dem morbus coerulus, der auch stets mit einer Hyperglobulie einhergeht und auch für diese Störung konnte der eine von uns die Ausscheidung von nicht vollständig verbrannten Oxydationsprodukten im Harn nachweisen.

Anm.: Ganz neuerdings hat Senator[2]) bei einem Fall von Polycythaemia rubra (Hyperglobulie mit Milztumor) eine Erhöhung des Respirationsstoffwechsels gefunden. Ob diese Tatsache für alle Fälle dieser Erkrankung zutrifft, steht noch dahin. Jedenfalls wurde dann dieser Form der Hyperglobulie eine prinzipiell andere Bedeutung zukommen, als den Hyperglobulien der oben erwähnten Krankheiten.

Beim Säugling sind die Aminosäuren zu normalen Zeiten von Langstein und Rietschel[3]) sowie von Samuely[4]) untersucht

[1]) Deutsche med. Wochenschr. **1905**, Nr. 48.

[2]) Senator, Ztschr. f. klin. Med. **60**.

[3]) Diese Ztschr. **1**, H. 1, S. 75.

[4]) Ztschr. f. physiol. Chem. **47**, 376.

worden. Während Samuely stets einen geringen Grad von Aminosäurenausscheidung fand, konnten Langstein und Rietschel beim gesunden Säugling mittels der E. Fischer-Bergellschen Methode Aminosäuren im Urin nicht nachweisen. Freilich stehen diesen Resultaten der direkten Bestimmung der Aminosäuren die Zahlen für die Aminosäurenwerte gegenüber, die mit der auch von uns angewendeten Pfaundlerschen Methode ermittelt wurden. Alle Autoren — und, das sei gleich vorweggenommen, auch wir — fanden einen relativ hohen Wert für den Stickstoff, der auf die Aminosäure kommt (10% gegen 3—4% beim Erwachsenen).

Anm.: Allerdings sind wir nicht ganz berechtigt, den Pfaundlerschen Aminosäurestickstoff nur auf ausgeschiedene Aminosäuren zu beziehen, da auch andere Stoffe (was auch Pfaundler hervorhebt), wie Hippursäure, Oxyprotsäure auf diese Fraktion mitentfallen und wir über ihre Ausscheidung beim Säugling bisher absolut nicht orientiert sind.

Wenn wir den Ablauf des Glykokollabbaus beim kranken Kind studieren wollten, so mußten wir zunächst Versuche darüber anstellen, wie der normale Organismus sich eingegebenem Glykokoll gegenüber verhält. Wollten wir dann etwaige Störungen dieses Abbaus ermitteln, so mußten wir den Glykokollstoffwechsel in einer Zeit ermitteln, in der der gesamte Stoffwechsel des Kindes am intensivsten alteriert ist, also bei den Intoxikationszuständen der schwer magendarmkranken Säuglinge (Enterokatarrh der Heubnerschen Schule). Um möglichst klare Versuchsbedingungen zu schaffen, gaben wir den Kindern an einem Tage eine Dosis von ca. 2 g Glykokoll und verfolgten den Ablauf der Ausscheidung der eingegebenen Aminosäure.

Die Methodik war folgende: Die Patienten wurden während der Versuchstage in der von Meyer modifizierten Bendix-Finkelsteinschen Schwebe aufgespannt. Diese Methode gestattet selbst Kinder zu untersuchen, die sich in dem Zustand schwerster Darmerkrankung befinden, ohne daß man einen Kollaps des Kindes zu befürchten braucht. Der Urin wurde so quantitativ aufgefangen, der Stuhl war nicht Gegenstand der Untersuchung. Die Methoden des Aminosäurenachweises sind in letzter Zeit als nicht unbedingt verläßlich von manchen Autoren angegriffen worden. Als eine der sichersten Methoden muß die von Neuberg und Manasse[1]) gefundene Naphtylisocyanat-Methode bezeichnet wer-

[1]) Berichte d. deutsch. chem. Ges. 38, 2359. 1905.

den. Besonders eignet sie sich für unseren Fall, da sie eine Vermehrung der Glykokollausscheidung zweifellos eindeutig anzuzeigen imstande ist. Dennoch haben wir geglaubt, die Resultate, die wir mit dieser Methode erhalten, mit einer zweiten in Vergleich setzen zu müssen und wendeten daher stets die indirekte Bestimmung der Aminosäuren neben der direkten an. Während der eine von uns (Rietschel) die Neuberg-Manassesche Methode ausführte, untersuchte der andere (Meyer, die Stickstoffverteilung nach Pfaundler[1]).

Im folgenden sei auf die Versuche im einzelnen eingegangen.

Versuch I.

Datum	Glykokoll-Einfuhr g	Urin-menge	Gesamt-N in g	Harn-stoff-N	Amino-säuren-N indirekt	Naphtyl-cyanat	Harn-stoff %	Amino-säuren %
13. II.		185	0,539	0,315	0,09	0,17	58,44	17,0
14. II.	1,805	123	**0,7476**	**0,4782**	0,0868	0,157 [2])	63,29	11,61
15. II.		150	0,7364	0,4396	0,0784	0,157 [2])	56,97	10,64

Versuch I. M. K. Alter 1 Monat, Gewicht 3500 g. Gesundes Brustkind, das sich normal entwickelt hat. Trinkmenge pro Tag 500 g.

Nach einem Vortage erhält das Kind 1,805 g Glykokoll; die Eingabe des Glykokolls erfolgt so, daß die gesamte Menge am Nachmittage des 2. Versuchstages bereits verabreicht wurde. Der 3. Tag konnte demnach bereits als Nachtag des Versuches angesehen werden.

Daß das eingeführte Glykokoll von dem Säuglingsorganismus vollständig resorbiert ist, zeigt mit Sicherheit die Erhöhung der Stickstoffausscheidung, die am 2. und 3. Tage vorhanden ist. Die Differenz der beiden Nachtage gegen den Vortag beträgt ca. 0,4 g N, das entspricht also ca. 2 g Glykokoll, das ist der eingeführten Menge. Die Ausscheidung erfolgt demnach quantitativ. Der Abbau vollzieht sich, wie aus der Tabelle klar hervorgeht, zu Harnstoff in der Weise, wie es in der Literatur bereits niedergelegt ist. Es erfolgt eine deutliche Vermehrung der Harnstoffausscheidung. Da die Verbrennung zu Harnstoff beim normalen Säugling restlos geschieht, sehen wir keine Erhöhung des Amino-

[1]) Ztschr. f. physiol. Chem. **80**, 75.

[2]) Mittelwert der Bestimmung von 2 Tagen.

säurenwertes nach Pfaundler eintreten und analog verhalten sich die nach Neuberg-Manasse direkt ermittelten Zahlen. Aber bei beiden Methoden fällt der schon eingangs erwähnte, immerhin beträchtliche Wert der Aminosäuren schon beim normalen Säugling auf.

Versuch II. K. R., künstlich ernährt, 3 ½ Monate alt, Gewicht 3600 g, hatte 6 Wochen vorher eine Nabelphlegmone durchgemacht, daher im Gewicht zurückgeblieben, jetzt in gutem Zustande, ist agil, lacht, guter Turgor und Farbe. Ernährung 5 mal 120 g Halbmilch mit 5 % Liebigzucker. Zunahme während des Versuchs 100 g.

Versuch II.

Datum	Glykokoll-Einfuhr g	Urin-menge	Gesamt-N in g	Harn-stoff-N	Amino-säuren-N indirekt	Naphtyl-cyanat	Harn-stoff %	Amino-säuren %
27. II.		310	1,302	1,008	0,126	0,239	77,41	9,67
28. II.	2,5	375	**1,798**	**1,802**	0,175	0,227	72,41	9,73
29. II.		280	1,372	0,9296	0,1108	0,227	67,75	8,08

Auch hier wieder am 2. Tage des Versuchs Eingabe von 2,5 g Glykokoll; die Resorption des eingeführten Glykokolls geht mit Sicherheit wieder aus den Differenzen der N-Ausscheidung hervor. Wiederum ist die Harnstoffzahl am zweiten Tage vermehrt, Aminosäurenstickstoff direkt bestimmt ganz unbeeinflußt, indirekt bestimmt ist ein ganz geringes Ansteigen zu konstatieren.

Versuch III. Ein schon etwas älteres (9 Monate) Kind, das an einer latenten Tetanie leidet. Der Zustand des Kindes in der Zeit des Versuchs ist indes gut, es ist in Gewichtszunahme begriffen, und hat außer der erhöhten Erregbarkeit des Nervensystems keine feststellbaren Abweichungen vom Physiologischen. Trinkmengen 900 g ⅔ Milch und 5 % Liebig-Zuckerzusatz.

Versuch III.

Datum	Glykokoll-Einfuhr g	Urin-menge	Gesamt-N in g	Harn-stoff-N	Amino-säuren-N indirekt	Naphtyl-cyanat	Harn-stoff %	Amino-säuren %
19. IV.		450	2,1948	1,9803	0,2415	0,286	79	11
20. IV.	2,0	580	**3,066**	**2,5305**	0,3098	0,308	72	10,1
21. IV.		405	2,4409	1,7094	0,2541	0,341	70	10
22. IV.		520	3,0674	1,9894	0,2597	0,341	64,9	8,5

Das am 2. Tage des Versuchs aufgenommene Glykokoll (2 g) markiert sich wieder deutlich in der N-Ausscheidung des Kindes. Die Stickstoffausscheidung ist in diesem Fall beträchtlich höher als in den voraufgegangenen Versuchen, entsprechend der bei dem Alter des Kindes größeren Nahrungs- und Eiweißaufnahme. Entsprechend der höheren N-Einfuhr ist auch der absolute Aminosäurenwert vermehrt und zwar gleichmäßig nach beiden Methoden. Das Glykokoll alteriert hier ebenso wenig wie in den vorhergehenden Versuchen die Aminosäurenausscheidung.

Versuch IV. Kind Sch. 6 Wochen alt, 2960 g Gewicht, kommt mit ganz leichter Benommenheit, hohem Fieber 40 ^{0}, spritzenden Stühlen ins Haus. Gleich am ersten Tag Eingabe von 2,0 Glykokoll. Ernährung 6 mal 80 g Molken. Unter der Ernährungstherapie bessert sich der Zustand rapid. Bereits am 2. Krankenhaustag kein Fieber mehr, Benommenheit vollkommen geschwunden, 1—2 gute Stühle. Zucker im Urin 0. — Diagnose leichter Fall von Intoxikation oder Enterokatarrh. Auffallend ist, daß in diesem Falle, bei dem wir nach der Krankengeschichte entschieden eine Alteration des Stoffwechsels erwarten dürfen, die Glykokollausscheidung den vorhergehenden Versuchen gegenüber verzögert erscheint. Trotzdem am 1. Tage gleich bei der Aufnahme das Glykokoll verabreicht wurde, wird erst am 2. Tage die Glykokollausscheidung durch N-Vermehrung im Harn manifest und zu gleicher Zeit steigt dieses Mal der absolute Wert des Aminosäurenstickstoffs nach der Pfaundler u. der Neuberg-Manasseschen Methode um ein geringes. Die Steigerungen sind zwar deutlicher als in allen vorhergehenden Versuchen, sind indes immer noch derart gering, daß man daraus keinerlei Schlüsse ziehen kann, zumal die Prozentzahlen des Harnstoffs vollkommen im Bereich des Normalen liegen.

Versuch IV.

Datum	Glykokoll-Einfuhr g	Urin-menge	Gesamt-N in g	Harn-stoff-N	Amino-säuren-N indirekt	Naphtyl-cyanat	Harn-stoff %	Amino-säuren %
16. V.		45	0,6258	0,503	0,0451	0,107	80	7,5
17. V.	2,0	285	1,176	0,7898	0,1174	0,201	67,1	10
18. V.		350	0,4757	0,3128	0,0394	0,211	65,76	8,3
19. V.		350	0,4756	0,3136	0,0616	0,175	65,94	12,9

Versuch V. Kind R., Alter 6 Wochen, Gewicht 3050 g, kommt ohne Anamnese ins Kinderasyl mit spritzenden dünnen Stühlen, verfallenem Aussehen, grauer Farbe, Bewußtseinsstörung, Temperatur 38,3.

Versuch V.

Datum	Glykokoll-Aufnahme g	Urin-menge	Gesamt-N in g	Harn-stoff-N	Amino-säuren-N	Harn-stoff %	Amino-säuren %
20. VII.	2,0	150	1,2264	0,7875	**0,2486**	**64,2**	**19,8**
21. VII.		45	0,9184	0,7574	0,0994	82,4	10,8
22. VII.		50	0,8288	0,6489	0,0903	78,3	10,9

Erhält am ersten Tage 2 g Glykokoll. Das Glykokoll erscheint bereits innerhalb der ersten 24 Stunden wieder im Urin; leider ist die direkte Aminosäurenbestimmung durch einen unglücklichen Zufall verloren gegangen. Bei den Pfaundlerschen Werten zeigt sich, daß am 1. Tage eine vermehrte Menge — absolut und relativ — von Aminosäuren ausgeschieden wird, und zwar überragt der absolute Aminosäurenwert des 1. Tages den der Nachtage um 0,15 g (bei den normalen Fällen höchstens 0,06 g) prozentual um fast 10 %. Der Harnstoffwert ist zwar am 1. Tage höher als an den beiden folgenden, ein Zeichen, daß der größte Teil des Glykokolls dennoch zu Harnstoff verbrannt wurde. Immerhin ist die prozentuale Harnstoffverteilung auch auffallend, am 1. Tage 64 % und am 2. und 3. Tage 82 % und 78 %.

Versuch VI, VII, VIII. Kind G., 3 Monate alt, 3850 g schwer, hatte bereits am 23. 2. eine Dyspepsie unter der Beobachtung der Fürsorgestelle durchgemacht. Gewicht damals 4300 g, am 27. 2. neue Erkrankung mit spritzenden wässerigen Stühlen, 38,5 Fieber, vollkommene Intoxikation, am 1. 3. Aufnahme ins Asyl. Befund bei der Aufnahme: Abgemagertes, jämmerlich schreiendes Kind, beträchtlicher Wasserverlust, Augen haloniert, ängstliches Gesicht, Benommenheit, Temperatur 38°, Katatonie, trockene Zunge, graue Hautfarbe, Zucker im Urin. Erhält am ersten Tage der Aufnahme 2,5 g Glykokoll, neben Teediät vom zweiten Tage an 100 g zentrifugierte Brustmilch.

2. 3. Der Eindruck, den das Kind macht, ist heute besser, reagiert auf Kneifen, Bewegungen sind lebhafter.

5. 3. Das Kind erholt sich nur langsam, Bewegungen sind immer noch merkwürdig pathetisch, keine erhöhte Temperatur.

14. 3. Nachdem das Kind bis jetzt mit 100 und 150 g zentrifugierter Brustmilch p. d. ernährt wurde, bekommt es nun 160 g Brustmilch und Buttermilch. Zunahme in drei Wochen von der Aufnahme an gerechnet 130 g.

Am 22. 3., dem ersten Tag des zweiten Versuches, macht das Kind zwar keinen schwerkranken Eindruck mehr, sein Stuhl, Temperatur sind normal, aber sein allgemeines Befinden ist noch nicht so, daß man das Kind als gesund bezeichnen kann. Am 22. wird das Kind wieder zum Versuch eingestellt und am 23. ihm wieder 2 g Glykokoll verabreicht. Ernährung: 160 g Brustmilch, 210 g Buttermilch. Sowohl bei der diesmaligen Gabe, wie auch während des allerschwersten akuten Stadiums der Erkrankung waren klinisch auf die Glykokolldarreichungen absolut keine schädlichen Folgen in dem Befinden des Kindes zu konstatieren. Ja bei der ersten Darreichung trat unter dem Glykokoll die „Entgiftung" des schwer erkrankten Kindes genau so ein, wie wir es sonst unter der üblichen Therapie bei solch schweren Fällen zu sehen gewohnt sind.

Vom 25. 3. ab bekommt das Kind weiter Allaitement mixte bis zum 29. 3., von da ab Buttermilch. Das Gewicht hebt sich allmählich wieder und beträgt am 26. 4. 4100 g. An diesen Tagen werden ihm im Stoffwechselversuch wiederum 2 g Glykokoll verabreicht.

Versuch VI.

Datum	Glykokoll-Einfuhr g	Urinmenge	Gesamt-N in g	Harnstoff-N	Aminosäuren-N indirekt	Naphtylcyanat	Harnstoff %	Aminosäuren %
1. III.	2,5	140	0,6405	0,2436	0,0564	0,216	**37,79**	7,9
2. III.		205	0,5822	0,21	**0,1722**	**1,198** [1])	**36,07**	**29,58**
3. III.		300	0,5208	0,4312	0,0784	**1,198** [1])	82,79	15,05

Das Bild, das die Stoffwechselbilanz bei dem VI. Versuche ergibt, weicht stark von den bisher besprochenen Resultaten ab. Die Resorption des Glykokolls geht auch hier wieder glatt von statten, wie wir aus der Differenz in der Stickstoffausscheidung zwischen dem Haupttag und den beiden Nachtagen ersehen. Aber bereits die Verteilung des Stickstoffes erscheint auffallend. Wir sehen hier am ersten und zweiten Tage des Versuches außerordentliche geringe Prozentzahlen für den Harnstoffstickstoff 37,79 und 36,07 gegen 60—80 % in den vorhergehenden Versuchen.

[1]) Mittelwert der Bestimmung von 2 Tagen.

Der Verminderung dieser Fraktion entspricht, wie wir aus den Tabellen ersehen, eine Erhöhung des Aminosäurestickstoffs, sowohl absolut als auch prozentisch. Freilich deckt der in der Aminosäurefraktion ausgeschiedene Stickstoff das Defizit an Harnstoff nur zum geringen Teil, doch wissen wir; daß bei diesen schweren akuten Ernährungsstörungen des Säuglings (Enterokatarrh oder Intoxikation) der Ammoniakanteil des Stickstoffs intensiv erhöht ist und Werte bis 50 % sind von Keller und Langstein und Meyer beobachtet. — Die direkte Bestimmung der Aminosäuren zeigt eine Erhöhung vom ersten Tage auf den zweiten, die beinahe das sechsfache von dem des ersten Tages beträgt (von 0,216 auf 1,198). Die indirekte Bestimmung zeigt ganz analog die Erhöhung des Aminosäurewertes auch erst am zweiten Tage, ein Zeichen, daß die Ausscheidung gegenüber den Versuchen beim normalen Kind verlangsamt ist. Leider konnte der Versuch aus klinischen Gründen nicht länger als drei Tage fortgesetzt werden, das Abklingen der Aminosäureausscheidung ist daher nicht abgewartet worden.

Es lag uns noch ob, den Nachweis zu führen, daß die ausgeschiedenen Aminosäuren, die wir mit der Neubergschen Methode erhielten, in der Tat unverbranntes Glykokoll waren. Die Naphtylcyanatprodukte wurden in Ammoniak gelöst, der Ammoniak über dem Heißwasserbad verdunstet, und Naphtylcyanat-Glykokollverbindung mit Baryum-Acetat gefällt. Eine Analyse ergab folgende Werte:

0,0331 g Naphtylcyanat-Baryumverbindung
ergaben 0,0106 g $BaCO_3$ = 0,0074 g Ba.

Gefunden für Ba = 22,2 %
Berechnet für Ba = 22,0 %
für die Formel

$(C_{10}H_7NH - CO - NHCH_2CO_2)Ba$ (= $C_{13}H_{11}O_3N_2)_2$ Ba.

Die aufgefundene Aminosäure war also in der Tat mit Glykokoll identisch.

Versuch VII.

Datum	Glykokoll-Einfuhr g	Urinmenge	Gesamt-N in g	Harnstoff-N	Aminosäuren-N indirekt	Naphtylcyanat	Harnstoff %	Aminosäuren %
22. III.		205	0,8442	0,672	0,1071	0,1808	79,6	12,82
23. III.	2,5	260	1,029	0,784	**0,1874**	**0,602**	76,19	**18,35**
24. III.		200	1,071	0,7308	**0,189**	**0,418**	68,23	**17,64**

Die in der Rekonvaleszenz des Kindes eingegebene Glykokollmenge (am zweiten Tage des Versuches) zeigt immer noch stark abweichende Verhältnisse. Am Vortage ist der Harnstoff und die Aminosäureauscheidnng sowohl absolut als auch prozentisch als normal zu bezeichnen. Umso deutlicher zeigt sich das Ansteigen der Aminosäurewerte nach der Eingabe des Glykokolls. Während mit der indirekten Methode gegen den Vortag eine Differenz von 0,1122 g N und ein Ansteigen des Aminosäurekoeffizienten auf 13 und 17 % zu konstatieren ist, steigt der direkt bestimmte Wert der Aminosäuren von 0,1808 auf 0,602 und ist auch am Nachtage noch nicht zum normalen abgesunken. Es ist also auch in diesem Versuche, wenn auch nicht so deutlich wie vorher, eine Herabsetzung der Glykokollverbrennung ausgesprochen.

Nachdem etwa vier Wochen später das Kind sich vollständig erholt hatte, wurde ein dritter Stoffwechselversuch unter denselben Bedingungen angestellt. Die Stickstoffbestimmungen, Harnstoffbestimmungen und die indirekte Aminosäurefraktion nach Pfaundler wurden leider nicht angestellt, sondern nur die Aminosäuren nach der Neubergschen Methode bestimmt.

Versuch VIII.

Datum	Aminosäure direkt bestimmt	Glykokoll-Einfuhr
20. IV.	0,292	
21. IV.	0,3318	2,5
22. IV.	0,252	

Die Zahlen für die Naphthylcyanatprodukte erscheinen absolut genommen, hoch, doch ist dabei Rücksicht zu nehmen auf die nun bei weitem erhöhte Stickstoffeinfuhr (800 g Buttermilch), die natürlich auch in einer Vermehrung des Aminosäurenstickstoffs zum Ausdruck kommt. Man vergleiche die Zahlen gesunder Kinder (Versuch II und III).

Aus den Zahlen der Tabelle geht hervor, daß die Aminosäureausscheidung auf Glykokolleinfuhr nicht mehr vermehrt ist, das Kind sich also bezüglich der Verbrennung normal verhält.

Auffallend ist, daß beim normalen Säugling in allen Versuchen ohne Einfuhr einer Aminosäure sowohl nach der direkten als auch nach der indirekten Methode ein beträchtlicher Wert auf den Aminosäurenstickstoff kommt. Während z. B. der Pfaundler-

sche Koeffizient, wie eingangs erwähnt, beim Erwachsenen 3—4 % des Gesamtstickstoffs beträgt, sehen wir in Übereinstimmung mit Pfaundler den Koeffizienten beim normalen Säugling rund 10% erreichen. Es müssen also beim Säugling schon normalerweise bestimmte Stoffe zur Ausscheidung gelangen, die unter diese Fraktion gelangen. Der eine von uns hat, dadurch veranlaßt, nach Aminosäuren im Harn normaler Säuglinge gefahndet, ohne zu einem sicheren Resultat zu kommen (im Gegensatz zu Samuely[1]). Indessen ist möglich, daß die Aminosäuren in irgend einer gebundenen Form ausgeschieden werden und so der Bestimmung entgehen. Daß etwa die Art der Nahrung von Belang sei, wie Pfaundler (a. a. O.) glaubt, halten wir nach unseren Versuchen nicht für wahrscheinlich, da wir bei den verschiedensten Ernährungsformen prozentisch ziemlich gleiche Zahlen für den Aminosäurenkoeffizienten fanden. Der Harnstoffkoeffizient beträgt beim normalen Kind in allen unseren Versuchen 60—80 %, ein Wert, der dem in der Literatur festgestellten entspricht.

Bei Einführung von Glykokoll verändert sich die Aminosäureausscheidung beim normalen Säugling unwesentlich. Wir sehen die absolute Harnstoffmenge steigen, den Harnstoffkoeffizienten und den Pfaundlerschen Koeffizienten aber nur sehr wenig beeinflußt; eine gewisse, wenn auch äußert geringe Erhöhung in den Zahlen der absoluten Aminosäurestickstoffausscheidung (nach der indirekten und nach der direkten Bestimmung) scheint allerdings schon beim normalen Kinde stattzufinden. Beim ernährungsgestörten Kinde ist diese Erhöhung noch etwas deutlicher. Manifest wird aber erst die mangelhafte Verbrennung der Aminosäure bei dem ganz schwer erkrankten Kinde, dessen allgemeines Befinden eine schwere Störung des Stoffwechsels anzeigte. (Acidose, Zucker im Urin.) Absichtlich haben wir es unterlassen in unseren Versuchen die Quantität der ausgeschiedenen Aminosäure exakt zu berechnen, da die angewendeten Methoden Unterschiede in der Ausscheidung zwar deutlich zu markieren imstande sind, aber eine einwandsfreie exakte Bestimmung nicht bieten. Die deutlichen und erheblichen Erhöhungen der Aminosäurenwerte beim schwer erkrankten Kinde zeigen aber mit Sicherheit, daß ein großer Teil des Glykokolls un-

[1]) A. a. O.

verbrannt den Organismus verlassen hat. Damit haben wir aufs neue festgestellt, daß diese Form der schweren Darmerkrankungen des Säuglings sich im Stoffwechsel des Kindes als eine schwere Schädigung der oxydativen Energie dokumentieren. Die Untersuchungen bilden demnach einen weiteren Baustein zu den bisher schon bekannten Störungen des Stoffwechsels im Fett- und Zuckerabbau, insofern wir die bei diesen Kindern stets auftretende Acidose als eine Störung des Fettstoffwechsels und die zu gleicher Zeit sie begleitende Laktosurie und Galaktosurie als Störung des Kohlehydratstoffwechsels auffassen. Es erscheint uns daher nach den Resultaten der neueren Forschung die Schwere des Krankheitsbildes des Enterokatarrhs der Säuglinge wesentlich bedingt zu sein durch die Alteration des Stoffwechsels, eine Auffassung, die neuerdings Finkelstein[1]) auf Grund rein klassischer Beobachtung vertritt.

---

[1]) Jahrb. f. Kinderh. 1907. S. 1.

Beitrag zur Kenntnis des Kreatins und Kreatinins im Stoffwechsel des Menschen.

Von

Kj. Otto af Klercker.

(Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Lund.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1906.)

Einleitung.

Das Kreatinin im menschlichen Harne wurde schon früh in genetischen Zusammenhang mit dem Kreatin gesetzt. Die Tatsache, daß das Kreatin in vitro bei Erwärmen mit Säuren ohne Schwierigkeit in sein Anhydrid, das Kreatinin, umgewandelt werden konnte, wurde ohne weiteres auf die intravitalen Verhältnisse übertragen. Mit dem Kreatin als Muttersubstanz des Harnkreatinins ließen sich selbstverständlich zwei Quellen der Kreatininausscheidung denken. Das Kreatinin konnte entweder endogen in der Muskulatur des eigenen Körpers aus dem hier stets gebildeten Kreatin, oder aus Kreatin, das von außen mit der Fleischnahrung zugeführt worden war, entstanden sein, exogenes Kreatinin. Für das Vorkommen beider Entstehungsarten hat man auch geglaubt Beweise gefunden zu haben. So wurde bei Tieren sowohl nach größeren Fleischgaben als nach Zufuhr von reinem Kreatin eine Vermehrung der Kreatininausscheidung von mehreren Forschern (Munck[1]), Meißner[2]), Voit[3]), Gruber[4])), festgestellt. v. Noorden[5]) sagt sogar in seinem bekannten Handbuch der Pathologie des

---

[1]) Munk, Deutsche Klinik **1862**, 299, zit. n. Voit.

[2]) Meißner, Ztschr. f. rat. Med. Dritte Reihe **31**, 284. 1868.

[3]) Voit, Ztschr. f. Biolog. **4**, 108. 1868.

[4]) Gruber, Ztschr. f. Biolog. **42**, 416. 1901.

[5]) v. Noorden, Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels. Zweite Aufl., Erster Band. Berlin **1906**, 520.

Stoffwechsels: „Die wichtigste Quelle für das Kreatinin bei normaler Ernährung ist das Kreatin der Nahrung. Daneben kommt das in den Muskeln des Körpers enthaltene Kreatin in Betracht.“ Auffälligerweise tritt auf einer anderen Stelle desselben Buches Magnus-Levy[1]) für die ganz entgegengesetzte Auffassung ein, nämlich daß das Kreatinin hauptsächlich in der Muskulatur des Körpers selbst gebildet wird. „Dafür“ sagt er, „daß das Harnkreatinin — abgesehen von dem in der Nahrung aufgenommenen — im wesentlichen aus dem Muskel stammt, dort aus anderen Materialien gebildet wird, sprechen die Erfahrungen bei vorgeschrittener Muskelatrophie.“ In bezug auf dieses endogene Kreatinin fiel das Problem seiner Entstehung mit der Frage von der Ursache der Kreatinbildung in den Muskeln zusammen. Daß das Kreatin wiederum bei der Zusammenziehung der Muskeln entstände, war für die ältere Liebigsche Anschauung über die Natur der Muskelarbeit sehr verlockend anzunehmen. Nach dieser war ja die Quelle der Muskelkraft hauptsächlich im Eiweiß zu suchen und als dessen Zerfallsprodukt ließ sich das N-haltige Kreatin unschwer auffassen. Diese Frage ist auch mehrmals experimentell in Angriff genommen, wobei man in Erfahrung zu bringen suchte, teils inwieweit der Kreatingehalt in arbeitenden Muskeln vermehrt wurde, teils inwieweit bei Menschen die Kreatininausscheidung im Harne durch starke Muskelbewegungen beeinflußt werden konnte. Verschiedene Forscher sind hierbei zu völlig widersprechenden Resultaten gekommen.

Es dürfte indessen von sehr geringem Interesse sein näher auf diese älteren Untersuchungen einzugehen[2]). Sie sind sämtlich mit einer Methode ausgeführt, die nach der jetzigen Auffassung nicht als zuverlässig gelten kann. Das Vorgehen ist im Prinzipe dasselbe, das schon von Pettenkofer[3]) angewendet wurde, als er den neuen Harnbestandteil entdeckte, der später von Liebig[4]) Kreatinin genannt wurde. Ein alkoholisches Extrakt auf dem vorher bis Sirupskonsistenz eingedampften Harne wird mit $ZnCl_2$

[1]) Magnus-Levy, bei v. Noorden a. a. O. S. 137.

[2]) Vgl. vor allem Voit a. a. O. S. 85—91 und Gregor, Ztschr. f. physiol. Chem. **31**, 98. 1900/1901, in welchen Arbeiten weitere Literaturangaben zu finden sind.

[3]) Pettenkofer, Ann. d. Chem. und Pharm. **52**, 97. 1844.

[4]) Liebig, Ann. d. Chem. und Pharm. **62**, 303. 1847.

versetzt, wobei unlösliches Kreatininchlorzink niedergeschlagen wird. Zu quantitativer Methode von Neubauer[1]) ausgearbeitet, wurde sie später von Salkowski[2]) verbessert, aber auch wenn sie auf diese von ihm angegebene Weise ausgeführt wird, ist sie nicht ganz sicher, ja wie Salkowski selbst einräumt, „auch bei aller Sorgfalt und ohne einen erkennbaren Fehler kann sie, wie es scheint, gelegentlich mißlingen". Es ist klar, daß Resultate, die mit einer so wenig zuverläßlichen Methode gewonnen worden sind, nur einen zweifelhaften Wert beanspruchen können. Wenn darum Folin[3]) im Jahre 1904 eine allem Anschein nach sehr zuverlässige kolorimetrische Kreatinin-Bestimmungsmethode veröffentlichte, wurde es klar, daß eine vollständige Revision der ganzen Kreatininfrage mit Anwendung dieser neuen Methode erheischt wurde. Vor allem waren es dabei drei Punkte, die ein besonderes Interesse darboten. 1. Das Vorkommen und die eventuelle Bedeutung exogenes Kreatinins im Harne. 2. Der Zusammenhang der endogenen Kreatininbildung mit der Muskelarbeit und 3. mit dem Eiweißumsatze. Der letzte Punkt wurde bald darauf von Folin selbst in Angriff genommen[4]). Die vorher allgemein gehegte Auffassung war wohl diejenige, die Hammarsten[5]) in seinem Lehrbuche zum Ausdrucke gebracht hat, daß die Kreatininmenge im Harne „im allgemeinen mit der Menge des Harnstoffes gleichen Schritt hält", d. h. direkt von der Größe des Eiweißumsatzes beeinflußt wird. Folin kam indessen zu dem ganz entgegengesetzten Resultat. Durch sorgfältige Untersuchungen an mehreren Individuen konnte er zeigen, daß bei kreatinfreier Nahrung der Eiweißgehalt derselben keinen Einfluß auf die Größe der Kreatininausscheidung ausübte. Die 24-stündliche Kreatininmenge des Harnes war im Gegenteil eine für jedes Individuum konstante Größe, während der entsprechende Gehalt an Gesamtstickstoff und Harnstoff auf bekannte Weise parallel mit der Eiweißzufuhr schwankte. Auf Grund dieser Untersuchungen wurde er zu einer neuen Theorie des Eiweißumsatzes im Körper gebracht. Man muß nach ihm streng zwischen

---

[1]) Neubauer, Ann. d. Chem. und Pharm. **119**, 35. 1861.

[2]) Salkowski, Ztschr. f. physiol. Chem. **10**, 119. 1886.

[3]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. **41**, 223. 1904.

[4]) Folin, American Journal of Physiol. **13**, 83 und 122.

[5]) Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., vierte Auflage, Wiesbaden **1899**, 434.

zwei voneinander völlig unabhängigen Arten des Eiweißstoffwechsels unterscheiden. Die eine Art ist sehr veränderlich in bezug auf ihre Größe, liefert als Stoffwechselendprodukte hauptsächlich Harnstoff und unorganische Sulfate, dagegen kein Kreatinin und wahrscheinlich auch keinen Neutralschwefel. Die andere Art ist ziemlich konstant, wird hauptsächlich durch Kreatinin und Neutralschwefel und in kleinerem Umfange durch Harnsäure und Ätherschwefelsäuren charakterisiert. Diese letztere Form von Eiweißstoffwechsel „probably constitute an essential part of the activity which distinguishes living cells from dead ones". Er nennt sie darum den Gewebsmetabolismus oder den endogenen Metabolismus, im Gegensatz zu der anderen Form, die mit dem Eiweißgehalte der Nahrung schwankt und die er als den exogenen oder intermediären Metabolismus bezeichnet. Er hat auch eine ganz neue Hypothese über die Bedeutung dieses letzteren aufzustellen versucht, worauf ich indessen hier nicht näher eingehen werde. So stand es mit der Frage, als ich mich im Sommer 1905 dazu entschloß, durch Versuche an mir selbst unter Anwendung der Folinschen Methode zuerst diese Ergebnisse Folins nachzuprüfen und demnächst die zwei anderen oben erwähnten Punkte zu erledigen. Indessen hatte, wie es sich zeigte, schon vorher v. Hoogenhuyze und Verploegh in Utrecht die Untersuchungen angefangen, die später im Schluß des Jahres 1905 veröffentlicht wurden[1]), als ich schon in vollem Gange mit meinen Versuchen war. Sie hatten zu ihrer Aufgabe gemacht, mittels der Methode Folins den Einfluß der Muskelarbeit auf die Größe der Kreatininausscheidung zu ermitteln. Durch sorgfältige und zahlreiche Selbstversuche gelang es ihnen, wie es scheint, völlig beweisend festzustellen, daß die Muskelarbeit unter normalen Verhältnissen keinen solchen Einfluß ausübt. Hierdurch war der obenerwähnte Punkt No. 2 außer Rechnung gestellt worden, und es blieb mir nunmehr nur die Frage von dem exogenen Kreatinin übrig. Die Arbeit der holländischen Forscher hat mich indessen zu einer vorläufigen Mitteilung der Resultate, wozu ich damals betreffs

---

[1]) Van Hoogenhuyze und Verploegh, Ztschr. f. physiol. Chem. **46**, 415. 1905, auch in holländischer Sprache bei Pekelharing, Onderzoekingen gedaan in het physiologisch laboratorium der Utrechtsche hoogeschool vijfde reeks VI Utrecht **1905**, 210.

dieser Frage gekommen zu sein glaubte, veranlaßt[1]). Später hat auch Folin[2]) selbst Untersuchungen über dasselbe Thema veröffentlicht, deren Resultate zum Teil mit den in meiner obenerwähnten Mitteilung vorgelegten übereinstimmen. Ich werde weiter unten nach dem ausführlichen Bericht meiner eigenen Untersuchungen Gelegenheit bekommen, näher anf die erwähnten Ergebnisse Folins einzugehen.

Es wird sich dann zeigen, daß die Übereinstimmung zwischen meinen Untersuchungen und denjenigen Folins die bei dem Punkte, bis zu welchem jene zur Zeit meiner früheren Mitteilung fortgeschritten waren, nur eine teilweise war, nunmehr in der Hauptsache als eine völlige gelten muß.

Die Aufgaben meiner Untersuchungen sind also hauptsächlich folgende gewesen. Erstens wünschte ich die Richtigkeit der Auffassung Folins, daß die Kreatininausscheidung von der Eiweißzufuhr unabhängig ist, zu prüfen, was auf die Weise geschah, daß ich die 24-stündliche Kreatininmenge des Harnes während nacheinander folgender Perioden von resp. eiweißarmer und eiweißreicher Diät bestimmte. Zweitens galt es die Frage zu erledigen, inwieweit das Harnkreatinin auch eine exogene Herkunft haben kann. Dieser letzten Aufgabe glaubte ich dadurch gerecht zu werden, daß ich an gewissen Tagen Kreatin und Kreatinin ententweder in Form von Fleisch bezw. Fleischextrakt oder in Reinsubstanz per os einnahm und das Schicksal der auf diese Weise in den Körper eingeführten Fleischbasen zu erforschen suchte.

Ehe ich indessen auf diese meine Untersuchungen eingehe, will ich jedoch zuerst einige Bemerkungen über die bei denselben angewandten Bestimmungsmethoden, besonders diejenigen des Kreatinins und Kreatins, mitteilen.

Methodik.

Die Kreatininbestimmungen habe ich, wie gesagt, nach der kolorimetrischen Methode von Folin mit Anwendung eines Kolorimeters von Dubosq ausgeführt. Für eine genauere Beschreibung dieser Methode, die auf Grundlage der Jaffeschen Kreatininreaktion mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung ausgearbeitet

[1]) Klercker, Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol. 8, 59. 1906.

[2]) Folin, Festschrift Olof Hammarsten gewidmet, Upsala und Wiesbaden 1906.

worden ist, muß aufs Original[1]) hingewiesen werden. Als Vergleich dient eine 8 mm hohe Flüssigkeitssäule einer halbnormalen Lösung von Kaliumbichromat, die nach Folin im Kolorimeter genau dieselbe Farbennuance und -intensität zeigt, wie 8,1 mm einer Lösung von 10 mg Kreatinin, die mit 15 ccm gesättigte Pikrinsäurelösung und 5 ccm 10%ige NaOH-Lösung versetzt und bis 500 ccm verdünnt worden ist. van Hoogenhuyze und Verploegh[2]) haben ein ganz ähnliches Resultat bekommen. Eine Kreatininlösung von derselben Stärke und auf dieselbe Weise behandelt und verdünnt ergab nach ihnen „als Mittel aus 10 Beobachtungen 8,14 mm (max. 8,2, min. 8,1)“. Eine im Kolorimeter abgelesene Flüssigkeitssäule von 8,1 mm schien also ziemlich genau 10 mg Kreatinin zu entsprechen.

Aller Sicherheit wegen habe ich dennoch folgende Kontrollbestimmung gemacht. Reines Kreatinin wurde auf die von Folin angegebene Weise aus Harn bereitet. 10 ccm einer Lösung hiervon, worin nach der Stickstoffbestimmung 9,66 mg Kreatinin vorhanden war, wurde kolorimetrisch nach Folin untersucht. Als Mittel aus 8 Ablesungen wurde hierbei eine Flüssigkeitshöhe von 8,36 mm (max. 8,5, min. 8,2) gefunden, was nach der Berechnung Folins 9,69 mg Kreatinin entsprechen würde. Demgemäß habe ich auch bei meinen Untersuchungen den von Folin angegebenen Normalwert von 8,1 mm meinen Berechnungen zu Grunde gelegt.

Die Methode kann jedoch nicht als im strengeren Sinne des Wortes völlig exakt betrachtet werden. Wie allen solchen optischen Methoden haftet ihr selbstverständlich immer etwas Subjektives daran. Davon abgesehen, daß es viel auf Übung ankommt, gibt es außerdem eine Reihe von Umständen, welche von Einfluß sind. So ist die Beschaffenheit der Beleuchtung nicht ohne eine gewisse Bedeutung. Nicht nur so, daß bei einbrechender Dunkelheit die Ablesungen sehr bald unsicher werden, auch eine zu große Helle ist ungeeignet. Bei direkter Sonnenbeleuchtung, auch wenn als Reflektor die Platte aus Milchglas, die sich an diesem Kolorimeter angebracht findet, angewendet wird, war es mir wenigstens nicht möglich, dasselbe Resultat

---

[1]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. **41**.
[2]) a. a. O.

zu bekommen, als wenn diffuses Licht mit dem Planspiegel reflektiert wurde. Ja bei Sonnenbeleuchtung ist es einfach nicht möglich, völlig dieselbe Farbennuance der beiden Felder des Kolorimeters zu bekommen. Es wäre darum gut gewesen, wenn man eine künstliche Lichtquelle von konstanter Stärke hätte anwenden können; es ist mir jedoch nicht gelungen irgend eine derartige ausfindig zu machen. Ich habe immer diffuses Licht benutzt während der hellsten Stunden des Tages und immer das Mittel aus wenigstens 5 Ablesungen gezogen. Nach einiger Übung wird es bald dahin kommen, daß unter diesen Umständen die verschiedenen Ablesungen höchstens 0,3 mm von einander abweichen und daß auch verschiedene Bestimmungen bis auf ungefähr dieselbe Fehlergrenze übereinstimmende Resultate liefern.

Ebenso wie Folin fand auch ich, daß, wenn die abgelesene Flüssigkeitshöhe sehr weit vom Normalwerte 8,1 mm abwich, die Werte nicht zuverlässig waren. Ich habe darum immer wie er zur Bestimmung eine Harnmenge von der Größe gewählt, daß die im Kolorimeter abgelesenen Flüssigkeitssäulen zwischen 5 und 13 mm lagen, und andernfalls die Bestimmung mit einer passenden Harnmenge wiederholt,

Nach van Hoogenhuyze und Verploegh übt die Temperatur auf die Reaktion insofern einen Einfluß, daß eine höhere Temperatur eine dunklere Färbung bewirkt. Ich glaube indessen annehmen zu können, daß ich immer Wasser von ungefähr derselben Temperatur zur Verdünnung gebraucht habe. Während der heißen Jahreszeit wurde dieses direkt aus der Wasserleitung genommen, während der kälteren wurde immer Leitungswasser, das so lange, bis es die Zimmertemperatur angenommen hatte, aufbewahrt wurde, angewandt.

Eine andere Frage ist die, inwieweit nicht der Harn irgendwelche Stoffe von auf die Reaktion störender Einwirkung enthalten kann. Die Frage wurde schon von Jaffe[1]) auf die Weise beantwortet, daß bei gewöhnlicher Temperatur keine der bekannten, normalen Harnbestandteile die für das Kreatinin charakteristische Pikrinsäurereaktion gaben, und auch nicht das Kreatin. Dagegen machte er darauf aufmerksam, daß das Aceton, das ja nicht selten unter gewissen pathologischen Zuständen im Harne vorkommt,

---

[1]) Jaffe, Ztschr. f. physiol. Chem. **10**, 399. 1886.

mit denselben Reagentien eine schwach rotgelbe Nuance gibt, die er jedoch kaum mit der bedeutend stärkeren, rein roten Kreatininfärbung verwechselt haben will. Folin[1]) hat außer Aceton auch Acetessigsäure, Acetessigäther und Schwefelwasserstoff „als störend gefunden“. Auf welche Weise diese Körper störend wirken, wird nicht erwähnt, wahrscheinlich wird wohl die ähnliche Farbreaktion mit Pikrinsäure gemeint. Bezüglich des Acetons indessen dürfte jedoch die schwache Färbung, die es mit Pikrinsäure bewirkt, auch nicht bei der quantitativen Kreatininbestimmung einen bemerkbaren Fehler herbeiführen können. Durch die große Verdünnung, die hier stattfindet, wird die Bedeutung derselben ganz gewiß völlig eliminiert. Dagegen ist das Aceton durch eine andere Eigenschaft gekennzeichnet, wovon, so viel ich weiß, die Rede bisher nicht gewesen ist, die aber ganz einfach bei Anwesenheit von Aceton in einer Kreatininlösung die Folinsche kolorimetrische Methode völlig unbrauchbar macht. Das Aceton hat nämlich die Fähigkeit, eine schnelle Erblassung der roten Kreatinin-Pikrinsäurefarblösung zu bewirken. Diese interessante Tatsache ergab sich bei einem Versuche, den Kreatiningehalt eines diabetischen Harnes, der ebenfalls reichlich Acetonkörper hielt, kolorimetrisch zu bestimmen. Es zeigte sich völlig unmöglich, zwei übereinstimmende Ablesungen zu machen; bei jeder folgenden Ablesung wurde die Höhe der Flüssigkeitssäule bedeutend höher gefunden, und gleichzeitig konnte man deutlich direkt sehen, wie die Stärke der Farblösung abnahm, so daß die rote Farbe schon nach ungefähr einer Stunde völlig verschwunden war, und eine einfach gelb gefärbte Lösung übrig blieb. Es trat indessen hierbei eine Erscheinnung ein, die mir anfangs einige Schwierigkeiten zu deuten verursachte. Ließ ich nämlich die nun blasse Lösung bis zum folgenden Tage stehen, erschien eine neue Rotfärbung, die sogar viel intensiver als die ursprüngliche war. Diese neue Färbung zeigte sich indessen in keinem Zusammenhang mit dem Aceton zu stehen, sondern war von der Glykose verursacht worden. Diese gibt ebenfalls mit Pikrinsäure und Natronlauge eine starke Rotfärbung, die jedoch bei gewöhnlicher Temperatur erst nach längerer Zeit erscheint, bei Erhitzung dagegen augenblicklich, ein Verhältnis, worauf übrigens schon Jaffe aufmerksam machte. In

[1]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. **41.** a. a. O.

Übereinstimmung hiermit konnte diese zweite Färbung auch nicht im mit Hefe behandelten Harne wahrgenommen werden. Dagegen war kein Unterschied in der Erblassung der Kreatininfärbung, die ebenso schnell wie vorher vor sich ging. Eine Probe desselben Diabetesharns wurde sodann anhaltend gekocht, und zum früheren Volumen wieder aufgefüllt. Die Legalsche und Gerhardsche Reaktionen gaben nun einen nur sehr schwachen Ausschlag und die kolorimetrische Bestimmung gelang auch ohne Schwierigkeit und ohne die schnelle Erblassung. Hiermit war es in hohem Grade wahrscheinlich gemacht worden, daß das Aceton an der schnellen Erblassung wirklich schuld war.

Normaler Harn, der mit 10% Aceton versetzt worden war, zeigte dasselbe Verhalten. Ein exaktes Ablesen im Kolorimeter war auch hier nicht möglich, die Flüssigkeitssäule wurde immer höher, nach 10 Min. war sie 3 mm höher, nach weiteren 10 Min. sogar 7 mm höher als anfangs, und nach einer Stunde war die Lösung völlig abgeblaßt. Wenn das Aceton durch anhaltendes Kochen entfernt und der Harn zum früheren Volumen aufgefüllt wurde, ging die Bestimmung glatt und gab dasselbe Resultat wie im ursprünglichen, entsprechend verdünnten Harne. Hiermit ist also auch der Weg, worauf die Kreatininbestimmung im acetonhaltigen Harne sich machen läßt, angezeigt worden.

Wie van H. und V. habe auch ich gefunden, daß mit der Folinschen Methode höhere Werte als mit der älteren Methode von Neubauer-Salkowski bekommen werden. In drei Versuchen, in denen ich den Kreatiningehalt des Harnes gleichzeitig mit beiden Methoden bestimmte, fand ich in 1000 ccm Harn folgende Kreatininmengen:

	Nach Neubauer-Salkowski	Nach Folin	Differenz	
	g	g	g	%
I	1,99	2,32	0,33	16,5
II	1,71	2,22	0,51	29,8
III	1,03	1,98	0,95	92,2

Bestimmung des Kreatins. Mit der Folinschen Methode läßt sich auch eventuell im Harne vorhandenes Kreatin sehr einfach nachweisen und auch quantitativ bestimmen. Solche Bestimmungen habe ich auch auf die von Folin[1]) angegebene

[1]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. 41. a. a. O.

Weise gemacht. 10 oder 5 ccm Harn, im letzteren Falle bis 10 ccm mit Wasser verdünnt, wurden mit 5 ccm $\frac{n}{1}$ HCl versetzt, in einem mit einem ungefähr 50 cm langen Steigrohre versehenen Kolben während drei Stunden auf einem kochenden Wasserbade erhitzt. Wenn es sich nur um kleinere Mengen handelt, wird unter diesen Umständen alles Kreatin in Kreatinin übergeführt. Nach Neutralisation wird eine kolorimetrische Kreatininbestimmung auf gewöhnliche Weise gemacht. Wenn der hierbei erhaltene Wert, das Gesamtkreatinin, größer als der direkt im Harne gefundene, das präformierte Kreatinin, ist, muß der Unterschied auf Vorhandensein einer entsprechenden Menge Kreatin bezogen werden. Hier ist jedoch daran zu erinnern, daß auch zwischen zwei direkt im Harne gemachten Bestimmungen kleinere Differenzen sich zeigen können. Auch bei aller Sorgfalt können die bei verschiedenen Bestimmungen einer und derselben Kreatininlösung im Kolorimeter beobachteten Flüssigkeitsäulen sogar 0,3 mm voneinander differieren. Bei Beurteilung der Resultate kolorimetrischer Bestimmungen vor und nach HCl-Behandlung muß dies also in Betracht gezogen werden. Erst wenn die abgelesene Flüssigkeitssäule bei der kolorimetrischen Bestimmung nach der HCl-Behandlung wenigstens 0,3 mm niedriger als bei der direkten Bestimmung ist, kann also mit irgend welcher Sicherheit das Vorhandensein von Kreatin als festgestellt angesehen werden; und je weiter sich der Unterschied von diesem Grenzwerte entfernt, mit desto größerer Gewißheit ist er selbstverständlich auf Kreatin zu beziehen. Ich werde dies mit ein paar Beispielen verdeutlichen. In 102 ccm Harn wurde der Gehalt an präformiertem Kreatinin kolorimetrisch zu 0,21 g und der Gesamtkreatiningehalt zu 0,27 g bestimmt [Ser. II, 5. Okt., 3,45 Uhr nm., Tabelle 5]. In dieser Harnmenge findet sich also eine 0,06 g Kreatinin entsprechende Kreatinmenge. Die Bestimmungen sowohl vor als nach HCl-Behandlung wurden hier mit 5 ccm Harn gemacht, vor der HCl-Behandlung war die Flüssigkeitssäule 8 mm, nach der Behandlung 6,2 mm hoch, d. h. 1,8 mm niedriger, ein Unterschied der weit außerhalb der Fehlergrenze liegt. Das Vorhandensein einer der Differenz entsprechenden Kreatinmenge ist also hier genügend sichergestellt. Ein andermal [Ser. IV, 20. März, Tabelle 8] fand ich in 1860 ccm Harn 1,69 g präformiertes und 1,75 g Gesamtkreatinin, also denselben Unterschied 0,06 g wie im vorigen Bei-

spiele. Ob der Unterschied indessen auch hier wirklich von Kreatin bewirkt wird, läßt sich nicht mit Sicherheit entscheiden. Bei der Bestimmung vor der HCl-Behandlung war die Höhe der Flüssigkeitssäule 8,9 mm, nach derselben 8,6 mm, d. h. eine Differenz von nur 0,3 mm, die sehr wohl auf Beobachtungsfehler beruhen kann. Beide Bestimmungen wurden hier mit 10 ccm Harn gemacht. Um beurteilen zu können, inwieweit eine zwischen dem Gesamtkreatinin uud dem präformierten Kreatinin bestehende Differenz wirklich auf Kreatin bezogen werden kann, ist also, besonders wenn der Unterschied nur klein ist, die Kenntnis der primären Differenzen zwischen den bezüglichen Flüssigkeitshöhen, die bei den kolorimetrischen Bestimmungen vor und nach der HCl-Behandlung des Harnes direkt beobachtet werden, ebenfalls erforderlich. Diese Zahlen sind darum auch in meinen Tabellen unter der Rubrik: primäre Differenz mitgeteilt worden.

Außer Kreatinin und Kreatin habe ich beinahe immer den Gesamtstickstoff des Harnes wie gewöhnlich nach Kjeldahl bestimmt. In drei von den Versuchsserien sind außerdem Harnstoff-, Ammoniak- und Harnsäurebestimmungen gemacht worden.

Die Harnstoffbestimmung geschah nach der Methode von Folin-Mörner[1]). In der Serie I wurde der Harn zuerst wie bei der älteren Methode von Mörner-Sjöqvist mit Baryumhydroxid und Alkoholäthermischung gefällt und die Bestimmung in dem Filrat gemacht. In den beiden anderen Serien wurde die Bestimmung direkt im Harne vorgenommen.

Das Ammoniak habe ich mit der ebenfalls von Folin angegebenen Methode[2]) bestimmt. Das Toluol, das zugesetzt wird um das Schäumen des Harnes beim Luftdurchblasen abzuschwächen, habe ich jedoch mit Vorteil gegen Paraffinum liquidum vertauscht. Ich habe außerdem eine andere kleine Veränderung insofern vorgenommen, daß ich den Luftstrom zuerst durch Schwefelsäure passieren ließ, um ihn völlig ammoniakfrei zu machen. Das Überspritzen von Schwefelsäure suchte ich durch ein dazwischen gesetztes Wattefiltrum zu verhindern. Das Luftdurch-

---

[1]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. **32**, **36** u. **37**; Mörner, Skand. Arch. f. Physiol. **4**, 297. 1903.

[2]) Folin, Ztschr. f. physiol Chem. **37**.

saugen habe ich immer drei Stunden lang fortgesetzt und habe mich überzeugt, daß nach dieser Zeit alles Ammoniak übergetrieben worden war.

Wie Folin habe ich auch Versuche mit Lösungen von Ammoniumchlorid gemacht, worin der Ammoniakgehalt gleichzeitig durch Destillation und Durchblasung bestimmt wurde. Ich habe völlig übereinstimmende Werte bekommen. Das Ammoniak wurde immer in doppelten Vorlagen aufgefangen, es zeigte sich jedoch immer, daß alles Ammoniak schon in der ersten Vorlage absorbiert worden war.

Die Harnsäurebestimmungen endlich habe ich mit der Methode von Hopkins-Folin[1]) ausgeführt.

Ich habe immer selbst als Versuchs-Individuum gedient. Ich bin jetzt 36 Jahre alt, völlig gesund, 187 cm lang, wohlgenährt, jedoch nicht fett. Mein Körpergewicht hat während der Zeit dieser Untersuchungen, da es an den allermeisten Tagen festgestellt wurde, zwischen 86,65 und 92,45 kg geschwankt. (Die Wägungen geschahen immer früh nüchtern gleich nach dem Aufstehen um 7 Uhr.)

Besteht ein Zusammenhang zwischen der Kreatininausscheidung und der Größe des Eiweißumsatzes?

Meine erste Untersuchung beabsichtigte, wie gesagt, die Richtigkeit der von Folin vorgelegten Ansichten über die Unabhängigkeit der Kreatininausscheidung von der Größe des Eiweißumsatzes im Körper zu kontrollieren.

Versuchsserie I.

Während 6 Tagen, vom 31. Juli bis 5. August 1905, nahm ich darum eine kreatinfreie, sehr eiweißarme Nahrung zu mir, die auf die von Landergren[2]) angegebene Weise zusammengesetzt und bereitet worden war.

Der N-Gehalt der verschiedenen Speisen wurde durch eigens angestellte N-Analysen bestimmt. Meine Werte stimmten alle sehr gut mit den von Landergren erhaltenen überein. Den Gehalt der Nahrung an Kohlenhydrat und Fett habe ich einfach nach den Analysen Landergrens

---

[1]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. 24.

[2]) Landergren, Skand. Arch. f. Physiol. 14, 125. 1903.

berechnet. Mit dieser Kost wurde täglich im Durchschnitt 3,5 g N oder 22 g N-Substanz[1]) zugeführt.

Am 6. August wurde die Diät plötzlich geändert, und von nun an während weiterer 6 Tage bis zum 11. August eine eiweißreiche, aber fortwährend kreatinfreie Kost genommen. Diese wurde aus Eier, Roggenbrot, Butter, Kartoffeln, Käse und Zucker in abgewogenen Mengen zusammengesetzt und ihr Gehalt an den verschiedenen Nahrungsmittelgruppen auf Grund bekannter Durchschnittsanalysen berechnet. Nach einer solchen Berechnung würde mit dieser Kost täglich im Durchschnitt 25 g N oder 156 g N-Substanz zugeführt werden. Die Nahrung der beiden Kostformen wurde immer auf drei ungefähr gleich große Mahlzeiten verteilt. Während der ganzen Versuchsserie wurde der Harn in 24stündlichen Mengen von 7 Uhr früh des einen Tages bis 7 Uhr des anderen Morgens aufgesammelt. Die Fäces jeder der beiden Kostperioden wurden von einander getrennt aufgesammelt und wie gewöhnlich eingetrocknet. Zur Abgrenzung derselben dienten in diesem Versuche Heidelbeeren.

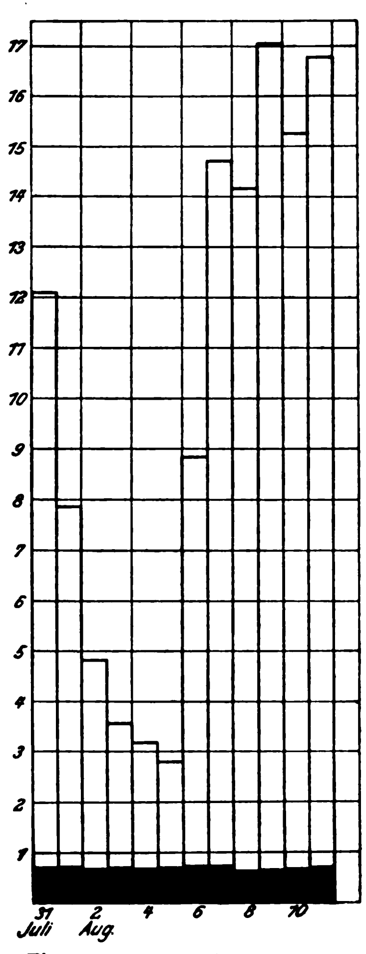


Fig. 1. 24stündl. Ausscheidung von Gesamt-N und Kreatinin-N in g während Versuchsserie I.

Der untere geschwärzte Teil bedeutet Kreatinin-N.

Im Harne wurde außer Gesamtstickstoff und präformiertem Kreatinin auch Harnstoff, Ammoniak und Harnsäure bestimmt. Auf Vorhandensein von Kreatin wurde dagegen diesmal nicht geprüft.

Das Resultat dieser Versuchsserie ist in den folgenden Tabellen 1 und 2 zusammengestellt worden. Vgl. auch Figur 1.

---

[1]) Mit N-Substanz verstehe ich immer die durch Multiplikation des N-Wertes mit 6,25 erhaltene Eiweißzahl.

Tabelle 1. N-Bilanz.

A. **Während kreatinfreier, N-armer Diät** (vom 31. Juli bis zum 5. August, 6 Tage): 195 g N-armes Brot (Landergren), 333 g Maizenacakes (Landergren), 158 g Kartoffeln, 173 g Butter, 10 g Zucker = **22** g N-Subst. (3,5 g N), **228** g Fett, **400** g Kohlehydrate, **48,4** Kalorien pro kg.

Datum 1905	Körpergew. kg	cm³ Harn	g N im Harn	g Fäces frisch	g Fäces trocken	g N in den Fäces		g N im Harn u. Fäces	g N in der Kost	Bilanz
31. Juli	87,6	755	12,10	595	171	10,51	1,75	13,85	3,54	— 10,31
1. Aug.	87,7	755	7,87				1,75	9,62	3,49	— 6,13
2. "	88,0	760	4,84				1,75	6,54	3,54	— 3,00
3. "	87,6	500	3,57				1,75	5,32	3,64	— 1,68
4. "	87,8	470	3,20				1,75	4,95	3,45	— 1,50
5. "	88,0	390	2,81				1,75	4,56	3,34	— 1,22

B. **Während kreatinfreier, N-reicher Diät** (vom 6. bis zum 11. August, 6 Tage): 543 g Hühnereier, 406 g Roggenbrot, 198 g Butter, 200 g Kartoffeln, 195 g Käse, 20 g Zucker = **156** g N-subst. (25 g N) **286** g Fett, **281** g Kohlehydrate, **45,2** Kalorien pro kg.

Datum 1905	Körpergew. kg	cm³ Harn	g N im Harn	g Fäces frisch	g Fäces trocken	g N in den Fäces		g N im Harn u. Fäces	g N in der Kost	Bilanz
6. Aug.	87,9	980	8,85	784	246	10,25	1,71	10,56	25,0	+ 14,44
7. "	88,4	1175	14,72				1,71	16,43	24,1	+ 7,67
8. "	—	785	14,18				1,71	15,89	25,4	+ 9,51
9. "	—	890	17,07				1,71	18,08	24,6	+ 6,52
10. "	88,2	830	15,28				1,71	16,99	24,6	+ 7,61
11. "	88,3	960	16,80				1,71	17,51	24,2	+ 6,69

In bezug auf das Kreatinin bekommen wir, wie wir sehen, durch diese Untersuchung eine völlige Bestätigung der Angaben Folins. Die Größe des Eiweißumsatzes hat gewiß keinen Einfluß auf die Kreatininausscheidung ausgeübt. Indem nämlich während der N-armen Diät die 24stündliche Menge des Gesamt-N von 12,10 bis 2,81 g sank und während der unmittelbar darauf folgenden N-reichen Diät wieder auf 16,80 g stieg, hielt sich die Kreatininmenge die ganze Zeit ziemlich konstant mit nur kleinen ungefähr gleich großen Schwankungen; während der N-armen Diät wurde durchschnittlich 1,87 g (max. 1,95, min. 1,78), während der N-reichen Diät durchschnittlich 1,83 g (max. 1,94, min. 1,71) Kreatinin ausgeschieden. Im Gegensatz zum Kreatinin ging das Harnstoff-N dem Gesamtstickstoff parallel. In bezug auf die übrigen stickstoffhaltigen Bestandteile des Harnes werde ich hier nur kurz das Verhalten der Harnsäure erwähnen.

Tabelle 2. N-Verteilung im Harn.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Datum 1905	Gesamt-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Harnsäure *Harnsäure-N*	Kreatinin *Kreatinin-N*	Rest-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Harnsäure-N	Kreat.-N	Rest-N
	in g pro 24 Stunden						in Prozent von Gesamt-N				
A. Während kreatinfreier, N-armer Diät.											
31. Juli	12,10	10,19	0,69	0,50 *0,17*	1,92 *0,71*	0,34	84,2	5,7	1,4	5,9	2,8
1. Aug.	7,87	5,85	0,40	0,58 *0,19*	1,95 *0,72*	0,71	74,3	5,1	2,4	9,1	9,0
2. „	4,84	3,12	0,14	0,54 *0,18*	1,78 *0,66*	0,74	64,5	2,9	3,7	13,6	15,3
3. „	3,57	2,14	0,17	0,48 *0,16*	1,88 *0,70*	0,40	59,9	4,8	4,5	19,6	11,2
4. „	3,20	1,78	0,12	0,50 *0,17*	1,82 *0,68*	0,45	55,6	3,7	5,3	21,2	14,1
5. „	2,81	1,53	0,07	—	1,85 *0,70*	—	54,4	2,5	—	24,9	—
B. Während kreatinfreier, N-reicher Diät.											
6. Aug.	8,85	7,14	0,31	0,52 *0,17*	1,94 *0,72*	0,51	80,7	3,5	1,9	8,1	5,8
7. „	14,72	12,65	0,67	0,62 *0,21*	1,93 *0,72*	0,47	85,9	4,5	1,4	4,9	3,2
8. „	14,18	12,26	0,56	0,57 *0,19*	1,71 *0,64*	0,53	86,5	3,9	1,3	4,5	3,7
9. „	17,07	15,04	0,64	0,56 *0,19*	1,76 *0,65*	0,53	88,1	3,7	1,1	3,8	3,1
10. „	15,28	13,45	0,67	0,58 *0,19*	1,78 *0,66*	0,31	88,0	4,4	1,2	4,3	2,0
11. „	16,80	14,61	0,69	0,56 *0,19*	1,88 *0,70*	0,61	87,0	4,1	1,1	4,2	3,6

Während der stickstoffarmen Diät wurde durchschnittlich 0,52 g (max. 0,58, min. 0,48), während der stickstoffreichen durchschnittlich 0,57 g (max. 0,62, min. 0,52) Harnsäure täglich ausgeschieden, d. h. praktisch genommen, ist die Harnsäure konstant geblieben. Dies stimmt mit der Auffassung Sivéns[1]) und Burians und Schurs[2]) sehr gut überein, nach denen die Harnsäureausscheidung von dem gewöhnlichen Eiweißumsatze ganz unabhängig ist. Ich werde später im anderen Zusammenhange hierauf wie auf die abweichende Ansicht Folins zurückkommen.

[1]) Sivén, Skand. Arch. f. Physiol. **11**, 308. 1901.

[2]) Burian und Schur, Arch. f. die gesamte Physiol. **80**, **87**, **94**.

Über das Schicksal des von außen in den Körper eingeführten Kreatins und Kreatinins.

Das bei kreatinfreier Nahrung mit dem Harne ausgeschiedene Kreatinin muß selbstverständlich beim Stoffwechsel im Körper selbst gebildet worden sein. Außer diesem endogen entstehenden Kreatinin hat man, wie wir in der Einleitung auseinandergesetzt haben, auch vom Harnkreatinin exogenes Ursprungs gesprochen. Nach dieser Auffassung würde ein größerer oder kleinerer Teil des Harnkreatinins von dem Kreatin des Fleisches herstammen können. Wenn dies richtig wäre, müßte also die Kreatininausscheidung durch Fleischzufuhr vergrößert werden. In der Absicht zu ermitteln, wie es sich hiermit verhält, wurden folgende Versuche angestellt.

Versuchsserie II.

Während einer Zeit von 15 Tagen vom 4. bis 18. Oktober 1905 wurde nur an bestimmten Tagen Fleisch genossen und zwar in Form von gehackten, ganz gelinde gerösteten Beefsteaks, um das Fleisch so wenig verändert wie möglich dem Körper zuzuführen. Die Nahrung der anderen Tage dagegen war völlig kreatinfrei mit Ausnahme vom 12. Oktober, da außerdem eine starke Liebigsche Fleischextraktlösung getrunken wurde. Die Zusammensetzung der Kost während der verschiedenen Tage der Versuchsserie ergibt sich aus Tab. 3. Die hier angegebenen Zahlen für die verschiedenen Nahrungsmittel sind nach bekannten Durchschnittsanalysen berechnet worden und können also, ebenso wie die Zahlen für die Energiezufuhr nicht anderes beanspruchen, als einen nur annähernden Fingerzeig zu liefern.

An den meisten Tagen wurde jede einzelne Harnmiction separat für sich aufbewahrt.

In jeder Harnportion wurde so bald als möglich der Gesamtstickstoff, das präformierte Kreatinin sowohl als das Gesamtkreatinin auf früher erwähnte Weise bestimmt. Am 7., 10., 11., 14., 15., 18. Oktober wurde der Harn indessen nicht in Einzelportionen aufbewahrt, sondern einfach für je 24 Stunden gesammelt, und in diesen 24-stündlichen Harnmengen wurden dieselben Bestimmungen gemacht. Die so gefundenen Werte dieser letzten Tage finden sich in der Tabelle 4, wo außerdem die nach den detaillierten Angaben der Tabelle 5 zusammengerechneten 24-stündlichen Werte der übrigen Tage zusammengestellt sind. Auf Fäces wurde in dieser Versuchsserie verzichtet.

Tabelle 3.

Datum 1905	Rindfleisch g	Hühnereier g	Roggenbrot g	Kartoffeln g	Butter g	Milch ccm	Sahne ccm	N-Subst. g	Fett g	Kohlehydrate g	Kalorien pro kg
4. Okt.	800	—	106	450	32	900	—	200	156	190	35,6
5. „	250	—	74	140	17	1560	—	125	111	145	24,2
6. u. 7. „	—	—	—	—	—	1500	—	56	53	75	11,6
8.—15. „	—	243	400	—	100	2000	300	150	242	486	54,9
16. „	600	—	300	100	100	2000	200	225	288	382	58,4
17. u. 18. „	—	243	400	—	100	2000	300	150	242	486	54,9

Tabelle 4.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Datum 1905	Körpergew. in kg	Harnmenge in ccm	Gesamt-N in g	Präformiertes Kreatinin in g	Gesamt-kreatinin in g	Kreatin[1]) in g (Primäre Differenz[2]) in mm)	Bemerkungen
4. Okt.	89,0	1552	24,60	**1,89**	**2,30**	**0,41**	800 g Rindfleisch
5. „	88,6	1052	10,55	**1,88**	**2,22**	**0,34**	250 g „
6. „	88,2	1037	19,16	1,73	1,79	0,06	
7. „	87,5	1198	16,86	1,89	1,89	0,00 (0,0)	
8. „	86,65	770	15,96	1,73	1,78	0,05	
9. „	87,2	1027	16,35	1,73	1,77	0,04	
10. „	88,3	1456	16,05	1,82	1,91	0,09 (0,3)	
11. „	—	1000	14,28	1,76	1,76	0,00 (0,0)	
12. „	89,15	1548	17,06	**2,48**	**2,66**	**0,18**	500 ccm Fleischextrakt-
13. „	89,0	1586	15,69	1,72	1,75	0,03	lösung =
14. „	89,1	1524	15,61	1,74	1,78	0,04 (0,2)	1,12 g Kreatinin 0,89 g Kreatin[3])
15. „	—	1431	15,83	1,73	1,70	— 0,03 (— 0,3)	
16. „	89,3	1776	22,46	**1,66**	**1,88**	**0,22**	600 g Rindfleisch
17. „	90,0	1668	18,97	1,76	1,77	0,01	
18. „	—	1595	16,02	1,90	1,90	0,00 (0,0)	

[1]) Unterschied zwischen Kolonne 6 und 5. Berechnet als Kreatinin.

[2]) Die Zahlen in Klammern bezeichnen die primären Differenzen in mm zwischen den vor und nach HCl-Behandlung des Harnes direkt im Kolorimeter beobachteten Flüssigkeitshöhen.

[3]) Berechnet als Kreatinin.

Wenn wir die Tabelle 4 (vgl. auch Fig. 2) durchsehen, bekommen wir hier keine sicheren Anhaltspunkte dafür, daß das Fleisch einen Einfluß auf die Größe der Kreatininausscheidung ausgeübt habe. Zwar finden wir die Kreatininausscheidung am 4. und 5. Oktober nach 800 und 250 g Fleisch etwas größer (1,89 bezw. 1,88 g) als im Durchschnitt während der Tage mit kreatinfreier Nahrung (1,77 g). Die Differenz ist jedoch nicht bedeutend und die Zahlen liegen beide innerhalb der normalen Variationsbreite. Die 24 stündliche Kreatininmenge schwankt ja während der Tage kreatinfreier Nahrung zwischen 1,72 und 1,90 g, An den beiden ersten Fleischtagen wurde also das Maximum der fleischfreien Tage nicht erreicht, und am letzten Fleischtage, 16. Oktober, nach 600 g Fleisch nicht einmal das Minimum (1,66 g).

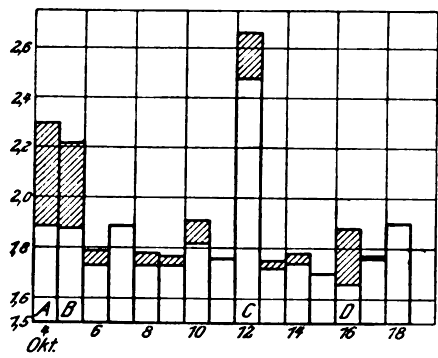


Fig. 2. 24 stündl. Ausscheidung von Gesamt-Kreatinin in g während Versuchsserie II. Der gestrichelte Teil deutet an, wie viel hiervon in Form von Kreatin ausgeschieden wurde.

A 800 g Rindfleisch,
B 250 g do.
C 130 g Fleischextrakt (2,01 g Gesamtkreatinin, wovon 1,12 in Form von Kreatinin, 0,89 in Form von Kreatin),
D 600 g Rindfleisch.

Die übrigen Tage kreatin- und kreatininfreie Nahrung.

Falls dagegen alles Kreatin des Fleisches wirklich in Form von Kreatinin mit dem Harne wieder ausgeschieden würde, hätten wir an den Fleischtagen nach 800, 250 und 600 g Rindfleisch ein Plus in der Kreatininausscheidung von wenigstens 1,21, 0,38 und 0,99 g finden müssen, wenn der Kreatingehalt dieses Fleisches niedrig zu 0,2 Proz. veranschlagt wird.

Nun läßt sich natürlich der Einwurf machen, daß ähnliche Versuche, um ganz beweisend zu sein, mit viel größeren Fleischmengen angestellt werden müßten. Ursprünglich hatte ich wirklich auch die Absicht jedesmal wenigstens 1 kg Fleisch zu speisen. Dies zeigte sich indessen nicht durchführbar, weil ich leider sehr bald einen so gewaltigen Ekel bekam, daß hierdurch schon vorher eine unüberwindliche Grenze für weitere Fleischzufuhr

gesetzt wurde. Dies ist also die einzige Ursache, warum ich nicht Versuche mit größeren Fleischquantitäten angestellt habe. Der Ekel war besonders am 5. Oktober sehr lästig. Nur mit großer Mühe konnte ich mir an diesem Tage 250 g Fleisch aufnötigen und ich konnte auch sonst außer Milch nicht viel essen (siehe Tab. 3). Auf der anderen Seite ist es aber klar, daß, wenn das Fleisch überhaupt eine Rolle bei der Kreatininausscheidung spielen würde, sein Einfluß schon bei in üblichen Kostformen vorkommenden Fleischmengen müßte nachgewiesen werden können. Unter gewöhnlichen Verhältnissen dürfte indessen kaum mehr als 600 oder 800 g Fleisch genossen werden.

Während also der Fleischgenuß keine merkbare Vermehrung des Harnkreatinins bewirkte, verhielt es sich anders mit dem Liebigschen Fleischextrakt. Am 12. Oktober, da eine Lösung hiervon (eine Büchse von der kleinsten Größe, 130 g Extrakt, in 500 g Wasser aufgelöst) eingenommen wurde, zeigte die Kreatininausscheidung eine nicht unbedeutende Steigerung. Nun wissen wir indessen, daß im Fleischextrakt außer Kreatin immer auch Kreatinin vorhanden ist. Bei der Darstellung des Fleischextraktes wird nämlich immer ein größerer oder kleinerer Teil des ursprünglichen Kreatins der frischen Muskeln, worin höchstens eine Spur von Kreatinin gefunden worden ist, durch das langwierige Erwärmen beim Abdampfen der Flüssigkeitsmengen in Kreatinin übergeführt. Es ist also mehr als wahrscheinlich, daß die Ursache der beobachteten Mehrausscheidung in diesem Kreatiningehalt des Fleischextraktes zu suchen ist. Auf gewöhnliche Weise bestimmte ich kolorimetrisch den Gehalt der Fleischextraktlösung an sowohl präformiertem als Gesamtkreatinin. Hiernach wurde 2,01 g Gesamtkreatinin zugeführt, wovon 1,12 g in Form von präformiertem Kreatinin, und also 0,89 g in Form von Kreatin. Im Harne dieses Tages wurde 2,48 g präformiertes Kreatinin gefunden. Dieser Wert übersteigt mit 0,71 g die Durchschnittszahl (1,77) für die Kreatininausscheidung während der kreatinfreien Tage. Von dem mit dem Fleischextrakt eingenommenen 1,12 g Kreatinin können also 0,71 g (= 63 Proz.) als wiederausgeschieden angesehen werden.

Somit bekommen wir also durch diese Versuche keine Anhaltspunkte für die Annahme, daß von außen mit Fleisch oder Fleischextrakt eingeführtes Kreatin im

Körper auch nur teilweise in Kreatinin übergeführt werde.

Um die Variationen in der Kreatininausscheidung während des Tages kennen zu lernen, machte ich an den meisten Tagen dieser Serie Bestimmungen mehrmals des Tages, in jeder gelassenen Harnportion. Die so ermittelten Zahlen finden sich in der Tabelle 5, wo ich in der Kolonne 7 auch die Größe der stündlichen Kreatininausscheidung während der zwischen den einzelnen Harnlassungen verwischten Zeitabschnitte ausgerechnet habe. Diese stündliche Kreatininausscheidung zeigt während der verschiedenen Ab-

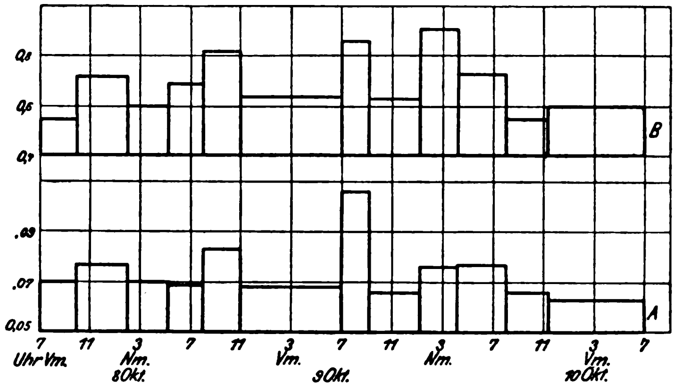


Fig. 3. Stündliche Ausscheidung in g während der verschiedenen Zeitabschnitte des Tages von *A* Kreatinin (nicht Kreatinin-N), *B* Gesamt-N.

schnitte des Tages mäßige Schwankungen, die jedoch keine Regelmäßigkeit darzubieten scheinen. Ich habe auch die stündliche Ausscheidung des Gesamt-N ausgerechnet, um nachzusehen, inwieweit ein Zusammenhang mit den Schwankungen hierin besteht. Als Beispiel weise ich auf die Figur 3 hin, wo die bezüglichen Zahlen für die Versuchstage 8. und 10. Oktober in Form von Kurven wiedergegeben worden sind. Die Kurve für das Gesamt-N ist in 10 mal kleinerem Maßstabe als die Kreatininkur vegezeichnet worden. Andeutungen zu einem gewissen Parallelismus der beiden Kurven fehlen ja nicht. Er ist jedoch nicht durchweg vorhanden und an den anderen Tagen ist er auch nicht immer so in die Augen fallend. Einige bestimmte Schlüsse sind also hieraus nicht zu ziehen.

Tabelle 5.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Datum	Tagesstunde	ccm Harn	Gesamt-N	Gesamt-Kreatinin	Präformiertes Kreatinin		Kreatin (Primäre Differenz¹) in mm)	Bemerkungen
					absolut	pro Stunde		
4. Okt.	10 Vm.	96	1,84	0,23	0,23	0,076	0,00 (0,0)	
	1,30 Nm.	189	2,59	0,28	0,27	0,077	0,01 (0,1)	400 g Rindfleisch
	4,30 "	145	2,37	0,27	0,26	0,086	0,01 (0,5)	
	9 "	296	5,03	0,39	0,35	0,077	0,04 (0,7)	400 g Rindfleisch
	11 "	93	1,96	0,18	0,16	0,080	0,02 (1,1)	
5. "	1,30 Vm.	152	2,70	0,25	0,17	0,068	0,08 (2,4)	
	5,30 "	386	5,65	0,50	0,31	0,077	0,19 (3,9)	
	7 "	195	2,46	0,20	0,14	0,093	0,06 (3,3)	
Summa	—	1552	24,60	2,30	1,89	—	0,41	—
5. Okt.	9,30 Vm.	137	2,47	0,18	0,18	0,072	0,00 (0,1)	
	1 Nm.	234	3,82	0,31	0,29	0,080	0,02 (0,5)	250 g Rindfleisch
	3,45 "	102	2,46	0,27	0,21	0,076	0,06 (1,8)	
	5,15 "	87	2,01	0,17	0,11	0,073	0,06 (2,3)	
	8 "	62	1,70	0,38	0,20	0,072	0,18 (4,4)	
6. "	7 Vm.	430	10,55	0,91	0,89	0,081	0,02 (0,2)	
Summa	—	1052	23,01	2,22	1,88	—	0,34	—
6. Okt.	1,30 Nm.	230	4,99	—	0,44	0,068	—	
	6,30 "	183	4,01	0,38	0,36	0,060	0,02 (0,9)	
	9,30 "	79	1,81	0,21	0,20	0,066	0,01 (0,3)	
7. "	7 Vm.	545	8,35	0,76	0,73	0,076	0,03 (0,5)	
Summa	—	1037	19,16	—	1,73	—	0,06	—

¹) Die Zahlen in Klammern bezeichnen die primären Differenzen in mm zwischen den vor und nach HCl-Behandlung des Harnes direkt im Kolorimeter beobachteten Flüssigkeitshöhen.

Fortsetzung der Tabelle 5.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Datum	Tages-Stunde	ccm Harn	Gesamt-N	Gesamt-Kreatinin	Präformiertes Kreatinin absolut	Präformiertes Kreatinin pro Stunde	Kreatin (Primäre Differenz in mm)	Bemerkungen
8. Okt.	10 Vm.	78	1,66	0,23	0,21	0,070	0,02 (0,4)	
	2 Nm.	144	2,89	0,31	0,31	0,077	0,00 (−0,1)	
	5,15 „	85	1,95	0,24	0,23	0,070	0,01 (0,1)	
	8 „	95	1,89	0,19	0,19	0,069	0,00 (0,3)	
	11 „	122	2,45	0,26	0,25	0,083	0,01 (0,2)	
9. „	7 Vm.	246	5,12	0,55	0,54	0,068	0,01 (0,2)	
Summa	—	770	15,96	1,78	1,73	—	0,05	—
9. Okt.	9,10 Vm.	94	1,86	0,23	0,23	0,106	0,00 (0,0)	
	1,15 Nm.	183	2,57	0,27	0,27	0,066	0,00 (−0,1)	
	4,15 „	228	2.73	0,24	0,23	0,076	0,01 (0,2)	
	8 „	195	2,76	0,29	0,29	0,077	0,00 (0,0)	
	11,20 „	101	1,84	0,23	0,22	0,066	0,01 (0,3)	
10. „	7 Vm.	226	4,59	0,51	0,49	0,063	0,02 (0,3)	
Summa	—	1027	16,35	1,77	1,73	—	0,04	—
12. Okt.	10 Vm.	101	1,60	0,21	0,20	0,067	0,01 (0,1)	500 ccm Fleischextraktlösung (Gesamtkreatingehalt 2,01 g, davon **1,12** g in Form von Kreatinin, **0,89** g in Form von Kreatin)
	1 Nm.	365	2,86	0,53	0,48	0,160	0,05 (0,5)	
	4 „	284	2,50	0,47	0,46	0,153	0,01 (0,2)	
	7,15 „	210	2,59	0,42	0,42	0,129	0,00 (−0,1)	
	10 „	133	1,91	0,28	0,26	0,094	0,02 (0,6)	
13. „	7,30 Vm.	455	5,60	0,75	0,66	0,069	0,09 (1,3)	
Summa	—	1548	17,06	2,66	2,48	—	0,18	—

Fortsetzung der Tabelle 5.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Datum	Tages-Stunde	ccm Harn	Gesamt-N	Gesamt-Kreatinin	Präformiertes Kreatinin absolut	Präformiertes Kreatinin pro Stunde	Kreatin (Primäre Differenz in mm)	Bemerkungen
13. Okt.	10 Vm.	170	2,12	0,31	0,31	0,103	0,00 (0,0)	
	1 Nm.	308	2,38	0,25	0,25	0,083	0,00 (—0,2)	
	4 „	268	2,16	0,23	0,24	0,080	—0,01 (—0,2)	
	7 „	198	2,06	0,22	0,20	0,067	0,02 (0,4)	
	9,40 „	82	1,13	0,17	0,17	0,064	0,00 (0,2)	
14. „	7 Vm.	560	5,84	0,57	0,55	0,059	0,02 (0,2)	
Summa	—	1586	15,69	1,75	1,72	—	0,03	—
16. Okt.	9 Vm.	55	0,83	0,11	0,11	0,055	0,00 (0,1)	300 g Rindfleisch
	12 M.	269	2,58	0,27	0,22	0,073	0,05 (1,9)	
	1,30 Nm.	—	—	—	—	—	—	300 g Rindfleisch
	3 „	345	3,11	0,30	0,23	0,077	0,07 (2,9)	
	8 „	387	5,53	0,45	0,40	0,080	0,05 (0,9)	
	11 „	220	3,48	0,25	0,20	0,067	0,05 (1,8)	
17. „	7 Vm.	500	6,93	0,50	0,50	0,063	0,00 (0,0)	
Summa	—	1776	22,46	1,88	1,66	—	0,22	—
17. Okt.	10 Vm.	134	2,33	0,25	0,25	0,083	0,00 (0,0)	
	1,30 Nm.	282	3,26	0,27	0,27	0,077	0,00 (0,0)	
	4,45 „	320	2,87	0,27	0,26	0,080	0,01 (0,2)	
	8,15 „	191	2,59	0,26	0,27	0,077	—0,01 (—0,3)	
	11,30 „	161	2,48	0,23	0,23	0,071	0,00 (—0,1)	
	7,15 Vm.	580	5,44	0,49	0,48	0,062	0,01 (0,3)	
Summa	—	1668	18,97	1,77	1,76	—	0,01	—

Was wurde aus dem mit dem Fleisch und dem Fleischextrakt in den Körper eingeführten Kreatin, wenn es nicht in Form von Kreatinin ausgeschieden wurde?

Schon ein ganz flüchtiger Blick auf die Kolonne 7 der Tabelle 4 (und Fig. 2) sagt uns, daß ein Teil desselben wieder unverändert durch die Nieren ausgeschieden worden ist. Am 4., 5., 12., und 16. Oktober, da Kreatin mit Fleisch oder Fleischextrakt dem Körper zugeführt wurde, finden wir nämlich Differenzen zwischen dem Gesamtkreatinin und dem präformierten Kreatinin des Harnes von bezw. 0,41, 0,34, 0,18 und 0,22 g.

Es fragt sich nur, ob dies alles wirklich von dem Kreatin des Fleisches oder Fleichextraktes herrühren kann. Es ist nämlich nicht zu verkennen, daß auch während der Tage kreatinfreier Nahrung das Gesamtkreatinin mehrmals größer als das präformierte Kreatinin gefunden wurde. Die Differenzen sind indessen während dieser Tage bedeutend kleiner und außerdem nicht mit Sicherheit auf Kreatin zu beziehen. Auch die primären Differenzen sind nämlich während dieser Tage sehr klein, nur viermal sind sie größer als 0,3 mm, nämlich (s. Tab. 5) zweimal 0,4 mm (8. Oktober, 10 Uhr vorm. und 13. Oktober, 7 Uhr nachm.), einmal 0,5 mm (7. Oktober, 7 Uhr vorm.) und einmal 0,9 mm (6. Oktober, 6 Uhr 30 Minuten nachm.).

Ganz anders verhält es sich während der drei Fleischtage. Die primären Differenzen sind hier so groß, daß sie ganz gewiß außerhalb der Grenze der Beobachtungfehler liegen und können also ruhig auf eine stattgefundene Kreatinausscheidung bezogen werden. Am ersten Fleischtage (Tab. 5) scheint jedoch eine Kreatinausscheidung von irgend welcher nennenswerten Größe bedeutend später nach der Einnahme als an den beiden anderen Tagen begonnen zu haben.

Ob indessen nach dem Fleischextrakt am 12. Oktober wirklich eine 0,18 g Kreatinin entsprechende Kreatinmenge ausgeschieden wurde, lasse ich zunächst dahingestellt sein, da die primären Differenzen wenigstens bei den ersten nach der Einnahme des Fleischextraktes gelassenen Harnportionen (1, 4 und 10 Uhr nm., Tab. 5) den Grenzwert der Beobachtungsfehler nicht oder nur wenig übersteigen. Wie dem auch sei, bestenfalls kann jedoch nur ein kleiner Teil (höchstens 20 %) von dem Kreatin des eingenommenen Fleischextraktes mit dem Harne ausgeschieden worden sein.

In meiner vorläufigen Mitteilung berechnete ich, daß am 4. und 16. Okt. nach 800 und 600 g Fleisch ungefähr 34 bezw. 24 % und am 5. Okt. nach 250 g Fleisch sogar 89 % von dem Krea-

tin des Fleisches im Harne wiedergefunden wurde. Diese Prozentzahlen wurden nach einem durchschnittlichen Gehalt des Fleisches von 0,2 % kristallisiertem Kreatin geschätzt. Es ist indessen sehr möglich, daß in Wirklichkeit ein weit kleinerer Bruchteil des eingenommenen Kreatins in den Harn übergegangen ist, wenn der Kreatingehalt des Fleisches, wie nicht unwahrscheinlich, größer gewesen ist. Neuere Forscher haben im Rindfleisch sogar mehr als 0,4 % Kreatin gefunden.[1]) Somit können also diese Zahlen nur wenig Interesse beanspruchen, höchstens vielleicht als obere Grenzwerte dienen. Die relativ große Kreatinausscheidung am 5. Oktober nach einer Menge von nur 250 g Fleisch kann möglicherweise ebenfalls ihre Erklärung in einem besonders reichlichen Kreatingehalt des Fleisches an diesem Tage finden.

Versuchsserie III.

Während dieser Serie lebte ich von meiner gewohnheitsmäßigen Kost, die eine gemischte, nicht sehr fleischreiche Diät darstellt. Die ganze Zeit vom 17. bis 26. November wurde jeden Tag das genossene Fleisch in dem fertig angerichteten Zustand gewogen. Am 23. November machte ich einen erneuerten Versuch mit Einnahme von Fleischextrakt.

Der Harn wurde für je 24 Stunden gesammelt, und dann wurde auf gewöhnliche Weise Kreatininbestimmung sowohl vor als nach HCl-Behandlung gemacht.

Tabelle 6 bringt das Resultat in leicht verständlicher Aufstellung. Vgl. auch Fig. 4.

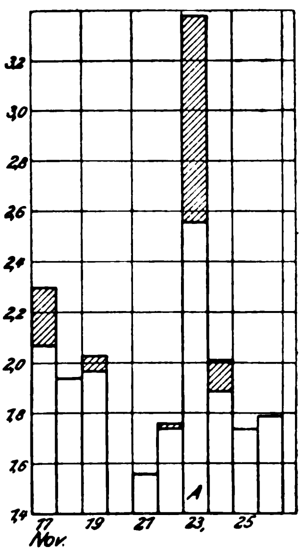


Fig. 4. 24stündl. Ausscheidung des Gesamt-Kreatinins in g während Versuchsserie III. Der gestrichelte Teil deutet an, wie viel hiervon in Form von Kreatin ausgeschieden wurde. *A* 260 g Fleischextrakt eingenommen. Die übrigen Tage gewöhnliche gemischte Diät, mit mäßigen Fleischmengen.

[1]) v. Hoogenhuyze und Verploegh a. a. O., S. 433.

Tabelle 6.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	
Datum 1905	Körpergewicht	24stünd. Harnmenge in ccm	Präformiertes Kreatinin in g	Gesamt-Kreatinin in g	Kreatin in g (Primäre Differenz[1]) in mm)	
17. Nov.	89,35	1175	2,07	2,30	0,23 (0,9)	200 g Rostbeef.
18. „	89,4	1435	1,94	1,94	0,00 (0,0)	225 g do.
19. „	—	996	1,97	2,03	0,06 (0,3)	170 g do.
20. „	90,0	—[2])	—	—	—	100 g Schweinekotelett.
21. „	—	1115	1,61	1,56	— 0,05 (— 0,2)	20 g gebratenes Schweinefleisch. 72 g Frikandellen.
22. „	—	1117	1,74	1,76	0,02 (0,1)	Kein Fleisch. Hering.
23. „	89,7	1581	**2,56**	**3,38**	**0,82** (2,4)	85 g Fleischfarce. 800 ccm Fleischextrakt-Lösung. (Gesamtkreatiningehalt 4,26 g, wovon 1,60 g als Kreatinin, 2,66 g als Kreatin.)
24. „	—	830	1,89	2,01	0,12 (0,4)	90 g Kalbskotelett, 30 g Beefsteak.
25. „	90,0	1292	1,74	1,74	0,00 (0,0)	Hering, 1 Kalbsniere, kein Fleisch.
26. „	—	1455	1,82	1,79	— 0,03 (— 0,1)	210 g Schweinefleisch, 1 Taschenkrebs.

Wenn wir zunächst vom 23. November absehen, finden wir die Kreatininausscheidung fortwährend insofern unverändert, daß ihre Schwankungen innerhalb ungef. derselben Grenzen wie in früheren Versuchen liegen (1,61—2,00 g). Die mittlere Kreatininausscheidung ist indessen etwas größer (1,85 gegen 1,77 in Serie II). In der Serie I sind wir jedoch bei kreatinfreier Nahrung einer gleich großen Kreatininausscheidung begegnet (1,87 bezw. 1,83 g). Es ist zwar nicht zu verkennen, daß die Kreatininausscheidung an den Tagen der reichlichsten Fleischzufuhr (am 17., 18. und 19. November) am größten ist. Da indessen die Differenzen nur klein

[1]) Die Zahlen in Klammern bezeichnen die primären Differenzen in mm zwischen den vor und nach HCl-Behandlung des Harnes direkt im Kolorimeter beobachteten Flüssigkeitshöhen.

[2]) Der Harn dieses Tages ging teilweise verloren.

sind und die Werte, wie erwähnt, im Bereiche der normalen Variationsbreite liegen, können wir aber nicht in diesem Umstande einen Widerspruch gegen das Resultat unserer früheren Versuche erblicken.

Nur viermal wurde das Gesamtkreatinin größer als das präformierte Kreatinin gefunden. Die primären Differenzen sind jedoch nicht groß und eine einigermaßen sichere Ausscheidung von Kreatin ist eigentlich nur am 17. November bemerkbar.

Am 23. November machte ich wie gesagt wieder einen Versuch mit Fleischextrakt. Eine Lösung von zwei Büchsen (260 g Extrakt) in 800 ccm Wasser wurde in zwei ungef. gleich großen Portionen geteilt, die erste Hälfte wurde um 11,30 Uhr Vm., die zweite um 1,30 Uhr Nm. getrunken. Wie im vorigen Versuche bestimmte ich auch hier sowohl das präformierte als das Gesamtkreatinin der Lösung. Nach dieser Bestimmung wurden 4,26 g Gesamtkreatinin, wovon 1,60 g in Form von präformiertem Kreatinin und 2,60 g in Form von Kreatin, mit der Lösung eingenommen. In dem Harne finden wir nun an diesem Tage eine deutliche Vermehrung der Kreatininausscheidung. Sie übersteigt die durchschnittliche Kreatininmenge der übrigen Tage mit 0,72 g. Auch Kreatin ist unzweifelhaft vorhanden. Seine Menge entspricht 0,82 g Kreatinin. Von dem zugeführten Kreatinin kann also ungef. 45 % und von dem Kreatin ungef. 31 % als wieder ausgeschieden angesehen werden.

In diesem Zusammenhange verdient es vielleicht hervorgehoben zu werden, daß toxische Wirkungen des Fleischextraktes, die man nach Kutscher und Lohmann[1]) auf Grund der Erfahrung bei Tieren erwarten konnte, nach meinen Versuchen zu urteilen, beim Menschen kaum zu befürchten sind. In meinen beiden Fleischextraktversuchen nahm ich ja, wie wir gesehen haben, die nicht unbedeutende Menge von resp. 130 und 260 g ein und habe dabei keine nennenswerte Unbehaglichkeiten verspürt.

Aus diesen Untersuchungen ging wenigstens soviel hervor, daß per os eingenommenes Kreatin und Kreatinin teilweise wieder als solches durch die Nieren ausgeschieden werden können, Kreatinin offenbar etwas leichter als Kreatin. Eine Stütze für die Annahme, daß exogenes Kreatin intravital, sei es auch nur teilweise,

---

[1]) **Kutscher und Lohmann**, Ztschr. f. physiol. Chem. **48**, 1. 1906.

in Kreatinin übergehe, konnte dagegen aus denselben nicht entnommen werden. So weit war ich schon in meiner vorläufigen Mitteilung gekommen. Es war indessen klar, daß die Richtigkeit dieses Resultats durch Versuche mit den reindargestellten Substanzen geprüft werden mußte. Von sich selbst drängte sich auch eine andere Frage auf. Da nur ein Teil der eingenommenen Fleischbasen im Harne wiedergefunden wurde, müßte ja offenbar der übrige Teil und hinsichtlich des Kreatins wahrscheinlich der größte Teil im Organismus auf irgend eine Weise ausgenützt worden sein. Es lag hierbei sehr nahe an eine Umwandlung in Harnstoff zu denken. Eine solche läßt sich, wie bekannt, in vitro unschwer machen, und durch Untersuchungen von Kossel wissen wir außerdem, daß das nahestehende Arginin durch ein von ihm in der Leber entdecktes Ferment (Arginase) eine Harnstoffabspaltung erleidet. Der Gedanke ist auch nicht neu. Von älteren Forschern ist das Kreatin ja oft als eine Vorstufe des Harnstoffs aufgefaßt worden. Sichere Beweise hierfür sind jedoch niemals geliefert worden. Wenn die Annahme richtig wäre, müßte aber die Einnahme von Kreatin bezw. Kreatinin eine Vergrößerung der Harnstoffausscheidung bewirken. Eine solche Vergrößerung würde selbstverständlich bei einer möglichst kleinen Harnstoffausscheidung am ehesten bemerkbar sein. Überlegungen in dieser Richtung hin veranlassten mich Versuche mit Einnahme von reindargestelltem Kreatin und Kreatinin bei einer Diät mit nur geringem Eiweißgehalt anzustellen.

Versuchsserie IV und V.

Aus äußeren Gründen mußten diese Versuche in zwei verschiedenen Serien vorgenommen werden. Die Diät war jedoch in beiden Serien auf dieselbe Weise zusammengesetzt. Sie bestand aus 200 g Hafermehl, 200 g Maizena, 300 ccm Sahne, 200 g Butter, mit einer genügenden Menge Wasser zu einem gleichförmigen Brei gekocht, und außerdem aus Apfelsinen und Zucker in abgewogenen Mengen. Der Brei wurde ebenfalls gewogen und auf drei ungefähr gleichgroße Mahlzeiten verteilt. Der Stickstoffgehalt des Breies wurde für jeden Tag direkt festgestellt, derjenige der Apfelsinen wurde dagegen nur einmal in einem Gemisch von mehreren Stücken bestimmt. Im Durchschnitt wurde mit dieser Diät 5,34 g Stickstoff oder 33 g N-Substanz in den Körper eingeführt. Der Stickstoffgehalt ist jedoch leider nicht völlig konstant gewesen. Er hat vielmehr zwischen 4,14 und 5,86 g geschwankt. Die Menge der übrigen

Nahrungsmittel habe ich wie in den früheren Versuchen nach bekannten Durchschnittsanalysen geschätzt.

Während beider Serien wurden täglich Bestimmungen von Gesamtstickstoff, Gesamtkreatinin und präformiertem Kreatinin in der 24 stündlichen Harnmenge gemacht. Sobald der Gasamtstickstoff sein Minimum erreicht zu haben schien, wurden außerdem Harnstoff-, Ammoniak- und Harnsäure-Bestimmungen gemacht.

In den Fäces, die durch Karmin abgegrenzt wurden, bestimmte ich nur den Stickstoffgehalt.

Das in den Versuchen eingenommene Kreatinin und Kreatin habe ich selbst hervorgestellt.

Die Herstellung des Kreatinins geschah nach der Methode Folins[1]), war jedoch mit vielen Schwierigkeiten verknüpft.

Aus ungefähr 10 Liter Harn bekam ich als Schlußprodukt nur 1,72 g einer Substanz, die sich als ein Gemenge von ungefähr ebensoviel Kreatinin als Kreatin herausstellte.

Die Ursache dieser schlechten Ausbeute ist mir eigentlich nicht recht verständlich. Ich bin den Vorschriften Folins genau gefolgt. Da der Harn vorher ziemlich lange unter Chloroform aufbewahrt worden war, wäre es ja denkbar, daß das ursprüngliche Kreatinin teilweise in Kreatin verwandelt worden war, kaum aber kann dies in der Ausdehnung vor sich gegangen sein, daß die Erklärung in diesem Umstande allein gesucht werden kann. Ebenso unerwartet war es eine so bedeutende Kreatinbeimengung zu finden. Bei der Zerlegung der Kreatininchlorzinkverbindung, deren Herstellung auch bei der Methode Folins in Frage kommt, wird immer ein Teil des Kreatinins in Kreatin verwandelt. Durch langwieriges Erhitzen mit H_2SO_4 soll indessen nach Folin das Kreatin in Kreatinin zurückgewandelt werden. Trotz einer 36 stündlichen Erhitzung war aber hier fortwährend unverändertes Kreatin in ungefähr ebenso großer Menge als Kreatinin vorhanden. In seiner letzten Publikation[2]) hat Folin indessen besonders darauf hingewiesen, daß die Versuche die Fleischbasen quantitativ in einander umzuwandeln oft mit unerwarteten Schwierigkeiten verknüpft sind, und er ist auch nicht im Stande gewesen, die Bedingungen für die Umwandlung einer einigermaßen bedeutenden Menge der einen Substanz in die andere feststellen zu können.

Die Substanz wurde nun in 200 ccm Wasser aufgelöst, die Lösung mit 2 Proz. HCl versetzt und während 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Durch diese Behandlung wurde wirklich eine Kreatininumwandlung des Kreatins bewirkt, jedoch bei weitem keine vollständige. Durch eine erneuerte kolorimetrische Bestimmung wurde nämlich das Vorhandensein in der Lösung von 0,99 g präformiertem Kreatinin und 1,35 g Gesamtkreatinin dargetan. Nach genauer Neutralisation mit NaOH wurde die

---

[1]) Folin, Ztschr. f. physiol. Chem. **41**.

[2]) Folin, Festschr. f. Hammarsten.

Lösung sodann getrunken, und auf diese Weise also ein Gemenge von 0,99 g Kreatinin und 0,42 g wasserfreies Kreatin (=0,36 g Kreatinin) in einer ungefähr 1½ proz. Kochsalzlösung eingenommen.

Das Kreatin wurde auf gewöhnliche Weise aus Pferdefleisch hergestellt. Aus 1000 g Fleisch bekam ich 2,7253 g Kristalle, die in lufttrockenem Zustand 27,63 Proz. Stickstoff enthielten (N-Gehalt des kristallisierten Kreatins = 28,19 Proz.). Die nach den N-Analysen zurückgebliebenen Kristalle wurden in 300 ccm Wasser aufgelöst und diese Lösung getrunken. Nach dem Stickstoffgehalt berechnet, wurde hierdurch 2,06 g wasserfreies Kreatin (= 1,77 g Kreatinin) in den Körper eingeführt.

Die Resultate der Versuche sind in den folgenden Tabellen 7—10 zusammengestellt worden.

Serie IV.

Diät: 200 g Hafermehl, 200 g Maizena, 300 ccm Sahne, 200 g Butter, 44 g Zucker, 318 g Apfelsinen = **88** g N-Subst. (5,34 g N), **259** g Fett, **378** g Kohlehydrate, **44** Kalorien pro kg.

24. März um 10 Uhr vorm.: 0,99 g Kreatinin und 0,42 g (wasserfreies) Kreatin eingenommen.

Tabelle 7. N-Bilanz.

Datum 1906	Körpergewicht kg	ccm Harn	g N im Harn	g Fäces frisch	g Fäces trocken	g N in Fäces		g N in Harn und Fäces	g N in der Kost	Bilanz
17. März	89,95	1540	12,00	887	212	9,83	1,40	13,40	4,14	— 9,26
18. "	89,97	1810	8,26				1,40	9,66	5,84	— 3,82
19. "	90,80	1450	5,16				1,40	6,56	4,93	— 1,63
20. "	90,60	1860	4,93				1,40	6,33	5,34	— 0,99
21. "	90,60	1845	4,70				1,40	6,10	4,87	— 1,23
22. "	90,00	1157	3,50				1,40	4,90	5,11	+ 0,21
23. "	90,00	1036	4,15				1,40	5,55	5,02	— 0,53
24. "	90,70	1685	**5,47**	346	104	5,03	1,01	**6,48**	**5,57** [1]	**— 0,91**
25. "	—	1425	4,87				1,01	5,88	5,49	— 0,39
26. "	90,70	1535	4,19				1,01	5,20	5,86	+ 0,46
27. "	90,90	1355	4,44				1,01	5,45	5,54	+ 0,09
28. "	90,90	1340	4,99				1,01	6,00	5,82	— 0,18

[1]) 5,07 g Nahrungs-N und 0,50 g Kreatinin- und Kreatin-N.

Tabelle 8.

Datum	Gesamt-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Harnsäure *Harnsäure-N*	Gesamt-kreatinin *Gesamt-kreatinin-N*	Präformiertes Kreatinin *Kreatinin-N*	Kreatin (Primäre Differenz[1]) in mm)	Rest-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Harnsäure-N	Gesamt-Kreatinin-N	Rest-N
1906	in g pro 24 Stunden								in % von Gesamt-N				
März 17.	12,00	—	—	—	1,76 *0,65*	1,71 *0,64*	0,05 (0,2)	—	—	—	—	5,4	—
18.	8,26	—	—	—	1,77 *0,66*	1,74 *0,65*	0,03 (0,1)	—	—	—	—	8,0	—
19.	5,16	—	—	—	1,72 *0,64*	1,75 *0,65*	—0,03 (—0,2)	—	—	—	—	12,4	—
20.	4,93	—	—	—	1,75 *0,65*	1,69 *0,63*	0,06 (0,3)	—	—	—	—	13,2	—
21.	4,70	2,91	0,45	0,60 *0,20*	1,83 *0,68*	1,78 *0,66*	0,05 (0,2)	0,46	61,9	9,6	4,3	14,5	9,7
22.	3,50	1,83	0,37	0,52 *0,17*	1,72 *0,64*	1,74 *0,65*	—0,02 (—0,1)	0,49	52,3	10,6	4,9	18,3	13,9
23.	4,20	2,22	0,36	0,52 *0,17*	1,82 *0,68*	1,78 *0,66*	0,04 (0,2)	0,77	52,9	8,6	4,0	16,2	18,3
24.	**5,47**	**3,06**	**0,38**	**0,60** *0,20*	**2,27** *0,84*	**2,24** *0,83*	**0,03** (0,1)	**0,99**	**55,9**	**6,9**	**3,7**	**15,4**	**18,1**
25.	4,87	2,93	0,42	0,51 *0,17*	1,72 *0,64*	1,66 *0,62*	0,06 (0,2)	0,71	60,2	8,6	3,5	13,1	14,6
26.	4,19	2,31	0,35	0,48 *0,16*	1,75 *0,65*	1,74 *0,65*	0,01 (0,1)	0,72	55,1	8,4	3,8	15,5	17,2
27.	4,44	2,61	0,35	0,51 *0,17*	1,67 *0,62*	1,69 *0,63*	—0,02 (—0,1)	0,69	58,8	7,9	3,8	14,0	15,5
28.	4,99	—	—	—	1,73 *0,64*	1,65 *0,61*	0,08 (0,3)	—	—	—	—	12,8	—

Fig. 5. 24stündl. Ausscheidung des Gesamt-Kreatinins in g während eiweißarmer, kreatinfreier Diät der Versuchsserie IV und V. Der gestrichelte Teil deutet an, wie viel hiervon in Form von Kreatin ausgeschieden wurde.
A 0,99 g Kreatinin und 0,42 g Kreatin eingenommen,
B 2,06 g Kreatin eingenommen.

[1]) Die Zahlen in Klammern bezeichnen die primären Differenzen in mm zwischen den vor und nach HCl-Behandlung des Harnes direkt im Kolorimeter beobachteten Flüssigkeitshöhen.

Serie V.

Diät: dieselbe wie in der Serie IV.
8. Mai um 9 Uhr vorm.: 2,06 g wasserfreies Kreatin eingenommen.

Tabelle 9. N-Bilanz.

Datum 1906	Körpergewicht kg	ccm Harn	g N im Harn	g Fäces frisch	g Fäces trocken	g N in Fäces	g N in Harn und Fäces	g N in der Kost	Bilanz
1. Mai	90,3	840	9,34			1,25	10,59	—	—
2. „	—	1320	8,54			1,25	9,79	5,16	— 4,63
3. „	91,8	990	5,32			1,25	6,57	5,68	— 0,89
4. „	92,07	1460	5,52			1,25	6,77	5,07	— 1,70
5. „	92,4	1700	5,31	1031	244	12,45 } 1,25	6,76	5,72	— 1,04
6. „	92,45	1860	4,82			1,25	6,07	5,33	— 0,74
7. „	92,0	1010	3,92			1,25	5,17	5,24	+ 0,07
8. „	91,65	1135	**4,67**			1,25	**5,92**	**4,97**[1]	**— 0,95**
9. „	91,5	455	3,65			1,25	4,90	5,41	+ 0,50
10. „	92,1	715	4,84			1,25	6,09	5,07	— 1,02

Hinsichtlich des Kreatinins (Tabelle 8 und Fig. 5) finden wir unsere früheren Ergebnisse bestätigt. Durch die Einnahme des Kreatinins am 24. März wurde die Kreatininausscheidung mit dem Harne deutlich vergrößert. Sie betrug diesen Tag 2,24 g gegenüber 1,72 in Mittel während der übrigen Tage dieser Serie. Von dem eingenommenen 0,99 g Kreatinin sind also 0,52 g (= 52,5 Prozent) als wiederausgeschieden anzusehen. Dagegen hat die Einnahme des Kreatins am 8. Mai (Tabelle 10 und Fig. 5) keinen Einfluß auf die Größe der Kreatininausscheidung bewirkt. Soweit war also eine völlige Übereinstimmung mit den früheren Versuchen vorhanden.

Wider alles Erwarten konnte indessen nichts von dem eingenommenen Kreatin als solches im Harne wiedergefunden werden. Am 24. März, da nur 0,42 g Kreatin (= 0,36 g Kreatinin) eingenommen wurde, wäre es ja denkbar, daß die Kreatinausscheidung wegen ihrer Geringfügigkeit schlechterdings der Beobachtung entgangen wäre. Aber auch nicht am 8. Mai (Tab. 10) nach 2,06 g Kreatin war ein auf Kreatin sicher hindeutender Unterschied zwischen dem Gesamtkreatinin und dem präformierten

[1]) **4,31 g Nahrungs-N und 0,66 g Kreatin-N.**

Tabelle 10.

Datum	Gesamt-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Harnsäure *Harnsäure-N*	Gesamtkreatinin *Gesamtkreatinin-N*	Präformiertes Kreatinin *Kreatinin-N*	Kreatin (Primäre Differenz[1]) in mm)	Rest-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Harnsäure-N	Gesamt-Kreatinin-N	Rest-N
1906	in g pro 24 Stunden								in % von Gesamt-N				
Mai 1.	9,34	—	—	—	1,71 *0,64*	1,71 *0,64*	0,00 (0,0)	—	—	—	—	—	—
2.	8,54	—	—	—	1,73 *0,64*	1,73 *0,64*	0,00 (0,0)	—	—	—	—	—	—
3.	5,32	—	—	—	1,78 *0,66*	1,78 *0,66*	0,00 (0,0)	—	—	—	—	—	—
4.	5,52	—	—	—	1,77 *0,66*	1,77 *0,66*	0,00 (0,0)	—	—	—	—	—	—
5.	5,31	3,15	0,51	0,51 *0,17*	1,77 *0,66*	1,78 *0,66*	—0,01 (—0,1)	0,82	59,3	9,6	3,2	12,4	15,5
6.	4,82	2,77	0,47	0,47 *0,16*	1,84 *0,68*	1,86 *0,69*	—0,02 (—0,1)	0,74	57,5	9,8	3,3	14,1	15,3
7.	3,92	1,96	0,38	0,52 *0,17*	1,76 *0,65*	1,80 *0,67*	—0,04 (—0,2)	0,76	50,0	9,7	4,3	16,6	19,4
8.	**4,67**	**2,69**	**0,36**	**0,51** *0,17*	**1,84** *0,68*	**1,79** *0,67*	**0,05** (0,2)	**0,77**	**57,6**	**7,7**	**3,6**	**14,6**	16,5
9.	3,65	1,78	0,41	0,53 *0,18*	1,82 *0,68*	1,78 *0,66*	0,04 (0,2)	0,60	48,8	11,2	4,9	18,6	16,5
10.	4,84	2,73	0,50	0,58 *0,19*	1,79 *0,67*	1,82 *0,68*	—0,03 (—0,1)	0,75	56,4	10,3	3,9	13,8	15,6

Kreatinin des Harnes zu bemerken. Von dem eingenommenen 2,06 g Kreatin ist also gar nichts in Form von Kreatin durch die Nieren wieder ausgeschieden worden.

Von den in diesen Versuchsserien eingenommenen Fleischbasen sind also am 24. März 0,47 g Kreatinin und 0,42 g Kreatin, am 8. Mai 2,06 g Kreatin nicht als solches im Harne wiedergefunden worden, d. h. bei der ersten Gelegenheit sind zusammen 0,31 g und bei der zweiten 0,66 g Stickstoff in Form von Kreatinin oder Kreatin in den Körper eingeführt worden ohne ihn wieder in denselben Verbindungen zu verlassen. Ist dies in Form von anderen Stickstoffverbindungen geschehen? Wäre dies der

---

[1]) Die Zahlen in Klammern bezeichnen die primären Differenzen in mm zwischen den vor und nach HCl-Behandlung des Harnes direkt im Kolorimeter beobachteten Flüssigkeitshöhen.

Fall gewesen, mußte er entweder als Harnstoff-, Amoniak-, Harnsäure-, oder Rest-N im Harne vorhanden sein.

Das Amoniak-N und Harnsäure-N zeigen indessen während beider Serien nur unbedeutende Schwankungen und an den Versuchstagen ist auch keine Vermehrung zu bemerken und sie können wohl darum auch ohne weiteres außer Rechnung gestellt werden.

Tabelle 11.

	Gesamt-N		$\left(\overset{+}{Ur}\right)$ N		(NH_3)N		$\left(\overset{-}{Ur}\right)$ N		Gesamt-Kreatinin-N		Rest-N	
	Ser. IV	Ser. V	Ser. IV	Ser. V	Ser. IV	Ser. V	Ser. IV	Ser. V	Ser. IV	Ser. V	Ser. IV	Ser. V
Am Versuchstage	5,47	4,67	3,06	2,69	0,38	0,36	0,20	0,17	0,84	0,68	0,99	0,77
Mittel der übrigen Tage derselben Serie	4,41	4,50	2,47	2,48	0,38	0,45	0,17	0,17	0,65	0,67	0,64	0,73
Mehrbetrag am Versuchstage .	1,06	0,17	0,59	0,21	0,00	−0,09	0,03	0,00	0,19	0,01	0,35	0,04

Die Größe des Rest-N am Versuchstage der Serie IV (24. März) wird zwar an keinem der anderen Tage erreicht und übersteigt außerdem mit 0,35 g den mittleren Wert dieser Tage. Am Versuchstage der Serie V (8. Mai) weicht das Rest-N jedoch kaum merkbar von dem Mittelwert der anderen Tage ab; an einem von diesen wurde sogar ein höherer Wert gefunden. Mit dem Harnstoff steht es nicht viel besser. Es ist gewiß nicht zu verkennen, daß das Harnstoff-N der beiden Versuchstage den mittleren Wert der übrigen Tage der beiden Serien nicht unbeträchtlich übersteigt. Die Bedeutung dieser Mehrbeträge ist jedoch sehr fraglich. Denn erstens könnte an dem wichtigsten der Versuchstage, 8. Mai, höchstens ein Drittel des an diesem Tage eingenommenen Kreatinstickstoffes (0,66 g) in dem beobachteten Zuwachs an Harnstoff-N (0,21 g) als wiedergefunden angesehen werden; und zweitens zeigt eben das Harnstoff-N schon an den übrigen Tagen der beiden Serien sehr bedeutende Schwankungen, so daß wir Werten begegnen können, die ebenso groß und größer als diejenigen der Versuchstage sind. Inwieweit also wirklich eine Umwandlung in Harnstoff oder in irgend welchen von den stickstoffhaltigen Körpern, deren Stickstoff in dem Rest-N

einbegriffen wird, wirklich stattgefunden hat, ist nicht möglich bestimmt zu entscheiden. In den Tabellen habe ich die verschiedenen Stickstoffwerte auch in Prozenten vom Gesamtstickstoff umgerechnet. Diese Prozentzahlen sind jedoch in nämlicher Beziehung nicht mehr belehrend. Die hier vorgelegten Zahlen gestatten kurzum kein positives Urteil über das Schicksal des im Harne nicht wieder gefundenen Kreatinins und Kreatins.

Wir müssen uns also damit begnügen durch diese Versuche mit den rein dargestellten Fleischbasen die Ergebnisse unserer früheren Versuche mit Fleisch- und Fleischextrakt in der Hauptsache bestätigt zu haben. Nur inbezug auf das Kreatin machte sich nämlich wie erwähnt, insofern ein verschiedenes Verhalten bemerkbar, daß während in den Fleisch- und Fleischextraktversuchen, wenigstens nach größeren Gaben, immer etwas Kreatin im Harne gefunden wurde, in den Versuchen mit rein dargestellten Substanzen dagegen auch nach Einnahme von 2 g wasserfreiem Kreatin keine merkbaren Mengen davon im Harne übergingen. Welche ist die Ursache dieses verschiedenen Verhaltens des Kreatins in den letzten Versuchen?

Zunächst wäre es ja möglich, daß die besondere Art und Weise, worauf das Kreatin in den Fleisch- und Fleischextraktversuchen zugeführt wurde, verantwortlich gemacht werden könnte. In Fleisch und Fleischextrakt ist ja außer Kreatin eine Menge von anderen teilweise noch sehr wenig erforschten Körpern vorhanden. Es wäre vielleicht nicht undenkbar, daß der eine oder andere von diesen, oder vielleicht eine noch völlig unbekannte Substanz des Fleisches eine Kreatinumwandlung im Organismus erleiden könnte. Auf diese Weise würde also das Fleisch und Fleischextrakt tatsächlich eine bedeutend größere Kreatinzufuhr zufolge haben können als ihr Gehalt an vorgebildetem Kreatin anzuzeigen scheint, und in den Versuchen mit Fleisch und Fleischextrakt würde somit Kreatin nur deshalb ausgeschieden worden sein, weil dessen Zufuhr wegen dieser supponierten Neubildung in der Tat so viel größer als in den anderen Versuchen war, daß das Kreatin nicht wie hier völlig ausgenützt werden konnte. Anderseits war es indessen auch möglich, daß das abweichende Verhalten des Kreatins in den letzten Versuchen in irgend welchem Zusammenhang mit dem sehr niedrigen Eiweißumsatz während dieser Versuche stehen konnte. Um die

Richtigkeit dieser Auffassung zu prüfen, wurde folgender Versuch angestellt.

Versuchsserie VI.

Während der Zeit dieser Serie vom 19. bis 26. Mai 1906 lebte ich von meiner gewöhnlichen, gemischten Kost. Da diese nur sehr mäßige Fleischmengen zu enthalten pflegt, war es, nach den vorigen Versuchen zu urteilen, ja auch nicht zu erwarten, daß eine Ausscheidung von Kreatin in irgendwie bemerkbaren Mengen hierdurch würde zustande kommen können, was auch nicht der Fall war.

Am 24. Mai wurde Kreatin eingenommen. Dies war auf gewöhnliche Weise aus Pferdefleisch hergestellt. 2,9821 g luftgetrocknete Kristalle, die 27,95 % Stickstoff enthielten, wurden in 350 ccm Wasser aufgelöst und die Lösung um 10 Uhr vorm. getrunken.

Nach dem N-Gehalt berechnet wurde auf diese Weise 2,59 g wasserfreies Kreatin (= 2,23 g Kreatinin) in den Körper eingeführt.

Tabelle 12.

Datum 1906	ccm Harn	Gesamt-N in g	Gesamt-Kreatinin in g	Präformiertes Kreatinin in g	Kreatin in g (Primäre Differenz[1]) in mm)	Bemerkungen
19. Mai	930	17,62	1,60	1,60	0,00 (0,0)	
20. „	980	17,65	1,78	1,72	0,06 (0,3)	
21. „	1007	17,20	1,93	1,91	0,02 (0,1)	
22. „	1265	19,13	1,86	1,86	0 (0,0)	
23. „	1010	16,12	1,90	1,90	0,00 (0,0)	
24. „	1170	17,40	**2,55**	**1,88**	**0,67** (2,7)	2,59 g wasserfreies Kreatin.
25. „	985	16,34	1,93	1,93	0,00 (0,0)	
26. „	915	17,04	1,92	1,92	0,00 (0,0)	

Aus der Tabelle 12 finden wir, daß mit dem Harne des Versuchstages Kreatin in einer 0,67 g Kreatinin entsprechenden Menge ausgeschieden wurde, d. h. 30 Proz. des eingenommenen Kreatins

[1]) Die Zahlen in Klammern bezeichnen die primären Differenzen in mm zwischen den vor und nach HCl-Behandlung des Harnes direkt im Kolorimeter beobachteten Flüssigkeitshöhen.

ist im Harne wieder gefunden worden. Dagegen hat die Kreatineinnahme wie gewöhnlich keine Vergrößerung der Kreatininausscheidung bewirkt. (Vgl. Fig. 6.)

Während also in der Serie V bei einer durchschnittlichen täglichen Eiweißumsatz von 4,54 g N. 2,06 g Kreatin zugeführt werden konnte ohne daß merkbare Mengen davon in den Harn übertraten, wurde hier dagegen bei einem vier mal so großen Eiweißumsatze (durchschnittliche N-Ausscheidung = 17,31 g) 30 Prozent von dem eingenommenen 2,59 g Kreatin durch die Nieren wieder ausgeschieden. Hiermit ist also bewiesen, daß die scheinbar schlechtere Ausnützung des Kreatins in der Serie V in irgend welchem Zusammenhang mit dem hier vorhandenen, niedrigen Eiweißumsatz stehen muß.

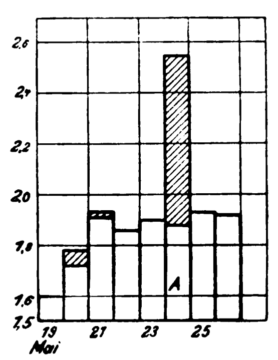


Fig. 6. 24stündl. Ausscheidung des Gesamt-Kreatinins in g während gewöhnlicher, gemischter, nicht eiweißarmer Diät der Versuchsserie VI. Der gestrichelte Teil deutet an, wie viel hiervon in Form von Kreatin ausgeschieden wurde. *A* 2,59 g Kreatin eingenommen.

Die Richtigkeit dieser Auffassung wurde durch die letzten Untersuchungen Folins[1]) bestätigt. Während eiweißarmer Diät (450—600 g Stärke und 400 ccm Sahne) gab er 1,1 bzw. 1,09 g kristallisiertes Kreatin ohne etwas davon im Harne wieder finden zu können. Nach größeren Gaben (5—6 g fand er dagegen zwar auch beim niedrigen Eiweißumsatz Kreatin im Harne, jedoch bei weitem nicht so viel wie bei eiweißreicher Diät.

Folin hat auch eine Erklärung dieses Einflusses der Eiweißzufuhr zu liefern versucht. Da er den im Harne vermißten Teil des eingenommenen Kreatins nicht in Form von irgend einem der anderen stickstoffhaltigen Harnbestandteile wiederfinden konnte, zieht er hieraus den Schluß, daß das Kreatin schlechterdings im Körper zurückgehalten worden ist. Das Kreatin muß nach ihm als eine Art Nahrungsmittel von spezifischer Bedeutung für den Gewebsstoffwechsel aufgefaßt werden, und darum wird es von dem Körper in desto größerem Umfang retiniert, je kleiner die Eiweiß-

[1]) Folin, Festschr. f. Hammarsten.

zufuhr und dadurch der Vorrat an kreatinbildendem Material ist. Das Kreatinin ist im Gegenteil ein reines Abfallsprodukt und wird darum schnell und beinahe vollständig wieder aus dem Körper ausgeschieden. In seinen beiden Kreatininversuchen fand er sogar 80 Proz. im Harne wieder nach Gaben von 1,1 bezw. 1,75 g Kreatinin.

Da ich leider nicht im Stande bin, überhaupt entscheiden zu können, inwieweit in meinen Versuchen eine Kreatinretention wirklich stattgefunden hat, kann ich keine bestimmte Stellung zu dieser Hypothese einnehmen, und verhalte mich darum vorläufig abwartend.

In bezug auf das rein tatsächliche, daß per os eingenommenes Kreatinin bedeutend leichter als das Kreatin in den Harn übergeht und daß die Eiweißzufuhr einen wesentlichen Einfluß auf das Übergehen des letzteren ausübt, kann ich dagegen auf Grund meiner eigenen Untersuchungen Folin völlig beistimmen.

Die Unabhängigkeit der beiden Fleischbasen von einander im menschlichen Stoffwechsel, wofür ich schon in meiner vorläufigen Mitteilung eintrat, hat sich also durch Folins und meine weiteren Untersuchungen völlig bestätigt. Die alte Ansicht, daß das Harnkreatinin teilweise von exogener Herkunft sein konnte, ist also nicht länger aufrecht zu halten.

Denn wenn es auch als bewiesen angesehen werden kann daß von außen eingeführtes Kreatinin wenigstens zu einem großen Teil den Körper unverändert mit dem Harne wieder verläßt, dürfte jedoch unter gewöhnlichen Verhältnissen präformiertes Kreatinin nur in ganz minimaler Menge dem Körper zugeführt werden. Bouillon, woran wohl zunächst zu denken wäre, wird ja niemals in gebräuchlichen Kostformen in der Stärke oder der Menge genossen, das Kreatinin in einer nur irgendwie nennenswerten Menge auf diese Weise eingenommen wird und daß hierdurch ein merkbarer Einfluß auf die Kreatininausscheidung mit dem Harne bewirkt wird. Da weiter eine Kreatininbildung aus exogenem Kreatin im Körper nicht nachweisbar ist, müssen wir aber einräumen, daß praktisch genommen das Harnkreatinin immer nur endogen im Körper gebildet wird.

Theoretische Schlußbetrachtungen.

Der Ausgangspunkt der älteren Ansichten über den Ursprung des Harnkreatinins bildete, wie in der Einleitung schon auseinandergesetzt wurde, die Überzeugung, daß dasselbe in erster Linie durch eine Umwandlung aus Kreatin entstanden wäre, wobei sowohl das exogene Kreatin der Fleischnahrung als das endogene Kreatin der eigenen Muskulatur in Frage kommen konnte. Die erste Entstehungsart ist wie schon dargelegt nicht länger annehmbar. Wie steht es mit dem Muskelkreatin in dieser Beziehung? Hierbei muß zuerst daran erinnert werden, daß ein Zusammenhang zwischen der Muskelarbeit und der Kreatininausscheidung nicht mit Sicherheit bei Anwendung einer zuverlässigen Methode hat nachgewiesen werden können. Auch nicht nach übermäßiger Muskelanstrengung fanden von Hoogenhuyze und Verploegh[1]) in ihren Selbstversuchen irgend welche Vermehrung der Kreatininausscheidung. Nur in einem Versuche an einer Hungerkünstlerin, zeigte sich wirklich nach einer am 7. Tage der Hungerperiode vorgenommenen Muskelarbeit am nachfolgenden Tage eine deutliche Vermehrung des Kreatinins, die sogar noch am dritten Tage fortdauerte.

Das Kreatinin wird also ziemlich sicher nicht durch die Zusammenziehung der Muskelfasern gebildet. Hiermit ist jedoch nicht bewiesen, daß es nicht ein Umwandlungsprodukt des Muskelkreatins ist, denn auch nicht für das Kreatin, das wohl ziemlich sicher in den Muskeln gebildet wird, ist es dargetan worden, daß es gerade bei der Muskelarbeit entsteht[2]). Es wäre indessen sehr eigentümlich, wenn das endogen in den Muskeln entstehende Kreatin eine Kreatininumwandlung im Körper erleiden würde, während von außen eingeführtes Kreatin nicht auf diese Weise umgewandelt wird. Es scheint mir also sehr fraglich, ob überhaupt ein biologischer Zusammenhang zwischen den beiden Fleischbasen besteht oder ob sie nicht völlig von einander unabhängig und unter verschiedenen Bedingungen im Körper gebildet werden. Welche Bedeutung indessen dem Kreatin zu teil werden kann, und besonders inwieweit die schon erwähnte Hypotese Folins sich fruchtbringend zeigen wird, läßt sich noch nicht übersehen. Jeden-

[1]) a. a. O.

[2]) Voit, a. a. O.

falls muß das Kreatin schon jetzt streng vom Kreatinin getrennt werden, so daß nicht Resultate, die in bezug auf dieses letztere gewonnen sind, ohne weiteres auf jenes hinübergetragen werden.

Aus welcher Vorstufe das Kreatinin im Körper entsteht, können wir vorläufig nicht sagen. Da die Kreatininausscheidung, wie wir gesehen haben,ganz unabhängig von der Eiweißzufuhr ist, kann es jedenfalls nicht als ein Zerfallsprodukt des Nahrungseiweißes aufgefaßt werden. Es bleibt uns darum nichts anderes übrig als uns dasselbe durch einen besonderen Metabolismus gebildet zu denken. Wir sehen uns also genötigt, außer dem gewöhnlichen Eiweißstoffwechsel, dessen Größe mit der Eiweißzufuhr wechselt und der durch Harnstoff als Stoffwechselendprodukt charakterisiert wird, mit Folin auch das Vorhandensein eines anderen, von diesem völlig unabhängigen Stickstoffwechsels anzunehmen, der ziemlich konstant ist, als Stoffwechselendprodukt unter anderen das Kreatinin liefert. Als spezifische Produkte dieses endogenen oder Gewebsmetabolismus betrachtet Folin, wie gesagt, außerdem den Neutralschwefel und zum kleineren Teil die Harnsäure und die Ätherschwefelsäuren. Über das Verhalten des Neutralschwefels und die Ätherschwefelsäuren besitze ich keine eigene Erfahrung. In bezug auf die Harnsäure kann ich in meiner Versuchsserie I, wie gesagt, zu demselben Resultat wie Burian und Schur und Sivèn, daß sie nämlich ganz unabhängig von dem gewöhnlichen Eiweißumsatz ist. Folin seinerseits fand dagegen, daß bei bedeutenderer Verminderung der Gesamtstickstoffausscheidung im Harne auch die absolute Menge der Harnsäure abnahm, jedoch nicht im Verhältnis zur Verminderung des Gesamtstickstoffs[1]). Gegenüber der Beweiskraft meiner Serie I könnte vielleicht geltend gemacht werden, daß die Periode der eiweißarmen Diät zu kurz war. Es ist nämlich nicht zu verkennen, daß die Harnsäureausscheidung während dieser Periode gerade gegen das Ende derselben ihr Minimum erreicht. Es könnte darum eingewendet werden, daß sie vielleicht noch weiter würde gesunken sein, wenn die Periode nur länger ausgedehnt worden wäre. Diesem widerspricht indessen das Ergebnis meiner beiden anderen Versuche mit eiweißarmer Diät, Ser. IV und V, die 5 bezw. 4 Tage länger dauerten, ohne daß dennoch die Harnsäureausscheidung unter das Minimum der Serie I herabsank.

[1]) Folin, The American Journal of Physiol. **18**, 87. 1905.

In dem Bestreben nach einer Erklärung des verschiedenen Verhaltens der Harnsäureausscheidung in seinen Versuchen und in denjenigen Burians und Schurs und Sivéns diskutiert Folin auch die Möglichkeit, ob nicht der Umstand, daß die Diät in den Versuchen dieser letzteren Forscher ziemlich viel Kartoffeln enthielt, auf die Harnsäureausscheidung könnte eingewirkt haben. In zwei von seinen eigenen Versuchen sah er nämlich eine bedeutende Vermehrung der Harnsäure, da eines Tages die Stärke in seiner Diät gegen Kartoffeln ausgetauscht wurde. In dieser Beziehung verdient es vielleicht erwähnt zu werden, daß die durchschnittliche Harnsäuremenge während aller meiner drei Versuchsserien mit eiweißarmer Diät konstant unverändert blieb, obschon die eiweißarme Diät in Serie I 158 g Kartoffeln, in den andern beiden keine enthielt. Und auch während der eiweißreichen Diät der Serie I, die 200 g Kartoffeln enthielt, wurde nur unbedentend mehr Harnsäure ausgeschieden.

Tabelle 13.

	Gehalt der Kost an		Tägliche Harnsäureausscheidung		
	N	Kartoffeln	Mittel	Maximum	Minimum
Serie I A	3,5	158	0,52	0,58	0,48
Serie I B	25	200	0,57	0,62	0,52
Serie IV	5,34	keine	0,53	0,60	0,48
Serie V	5,34	keine	0,52	0,58	0,47

Ich habe meine Erfahrung in bezug auf die Harnsäureausscheidung und ihr Verhalten zum Eiweißumsatz hier nur kurz erwähnen wollen, wage indessen nicht, auf Grund dieses einzigen Falles besonders mit Hinsicht zu dem entgegengesetzten Resultate, das Folin übereinstimmend in seinen vielen Versuchen bekommen hat, einen bestimmten Standpunkt zu dieser Frage einzunehmen. Vielleicht können individuelle Verschiedenheiten vorhanden sein, was auch Folin einräumt. Eine weitere Prüfung scheint hier erforderlich zu sein.

Künftigen Untersuchungen muß es auch vorbehalten werden, zu entscheiden, inwieweit der mehrerwähnte Gewebsmetabolismus als einheitlicher Vorgang aufzufassen ist. Es wäre ja sehr möglich, daß wir hier mit mehreren voneinander unabhängigen,

endogenen Stoffwechselprozessen zu tun haben. Während z. B. die Harnsäure als Zerfallsprodukt der Nukleoproteide aufzufassen wäre, würde das Kreatinin aus gewissen anderen Zellbestandteilen und auch unter anderen Bedingungen entstehen. Offenbar läßt sich diese Frage experimentell erforschen.

Als Gegengrund dieser hier vorgetretenen Auffassung, wonach das Kreatinin als ein Zerfallsprodukt eines spezifischen Gewebstoffwechsels aufzufassen ist, könnte bei einer oberflächlichen Betrachtung vielleicht das Verhalten der Kreatininausscheidung beim völligen Hunger angeführt werden. van Hoogenhuyze und Verploegh fanden nämlich, daß die Kreatininausscheidung im Versuche mit der Hungerkünstlerin unter dem Einflusse des völligen Hungers bedeutend vermindert wurde. Nach Voit wird indessen beim vollständigen Hunger, mit Ausnahme der ersten Tage, nur Organeiweiß zersetzt; und darum könnte man ja eher eine Vermehrung der Kreatininausscheidung erwartet haben. Der Zerfall von Organeiweiß im Sinne Voits kann jedoch nicht mit dem Gewebsmetabolismus Folins identifiziert werden. Das Organeiweiß ist, was speziell Pflüger kräftig betont hat, ein sehr unbestimmter Begriff, es ist überhaupt kaum mehr als ein Begriff, es läßt sich chemisch weder durch irgend welche spezifischen Eigenschaften noch durch besondere Zersetzungsprodukte charakterisieren. Anders mit dem Gewebskatabolismus Folins. Dieser ist einfach als ein durch die Vitalität der Zellen bedingter Zerfall lebender Zellbestandteile, wobei unter anderem das spezifische Zerfallsprodukt Kreatinin geliefert wird, zu definieren. Wenn also die Kreatininausscheidung beim Hungern vermindert wird, muß das durch ein vom Hungerzustande bedingtes Darniederliegen der Vitalität der Körperzellen erklärt werden.

Eine andere Sache ist die, ob es ganz sicher ist, daß der Stoffwechsel derjenigen Personen, die das Hungern berufsmäßig betrieben, als völlig normal betrachtet werden kann, und ob es darum auch angezeigt ist, Resultate, die an ähnlichen Versuchsindividuen gewonnen werden, ohne weiteres zu verallgemeinern.

Daß eine sogar bedeutende Unterernährung während kurzer Zeit ohne Einfluß auf die Kreatininausscheidung ist, geht aus meiner Versuchsserie II hervor, in welcher am 6. und 7. Oktober nur ungefähr 11 Kalorien pro kg Körpergewicht zugeführt wurden, ohne daß die Kreatininausscheidung vermindert wurde.

Ich beabsichtige indessen diese Frage weiter an chronisch Unterernährten zu verfolgen, wie mich überhaupt weiterhin zum Studium der Kreatininausscheidung bei den verschiedenen pathologischen Zuständen hinzuwenden, wobei natürlich zuerst an solche Fälle, die wegen einer veränderten Zellvitalität in Verdacht zu stehen scheinen, zu denken ist.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen, insofern sie auf das Kreatin und Kreatinin Bezug haben, fasse ich in folgende Sätze zusammen:

1. Es ist sehr fraglich ob ein biologischer Zusammenhang zwischen den beiden Fleischbasen besteht.

2. Wenn sie dem Organismus zugeführt werden, können sie beide teilweise in unveränderter Form durch die Nieren ausgeschieden werden. Eine Umwandlung des einen Körpers in den anderen kommt dagegen im Organismus nicht zustande.

3. Das Kreatinin geht leichter und in größerem Umfange in den Harn über. Auf das Übergehen des Kreatins übt indessen die Größe der Eiweißzufuhr insofern einen Einfluß, daß das Übergehen offenbar bei geringer Eiweißzufuhr bedeutend erschwert wird.

4. Da exogenes Kreatin im Organismus nicht in Kreatinin verwandelt wird und Kreatinin in den üblichen Kostformen nur in sehr geringen Mengen vorkommt, muß das Harnkreatinin immer endogen im Organismus selbst entstanden sein.

5. Aus welcher Vorstufe es hier gebildet wird, wissen wir nicht. Ein Zusammenhang mit dem Kreatin der Muskulatur ist jedenfalls nicht bewiesen und auch nicht sehr wahrscheinlich.

6. Da weiter das Kreatinin nicht als ein Zerfallsprodukt des Nahrungseiweißes aufgefaßt werden kann, bleibt kaum etwas anderes übrig als uns dasselbe mit Folin durch einen vom gewöhnlichen Eiweißumsatze gesonderten Metabolismus gebildet zu denken.

Zuletzt erlaube ich mir, an dieser Stelle meinem Freunde, Prof. Ivar Bang, in dessen Laboratorium diese Arbeit ausgeführt worden ist, meinen besten Dank zu sagen für das große Interesse, das er meinen Untersuchungen zu Teil werden ließ.

Quantitative Studien über Phagocytose.

I. Resistenz von Phagocyten gegenüber Wasserzusatz.

Von

H. J. Hamburger und **E. Hekma.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1906.)

1. Einleitung.

Die geplanten Untersuchungen, von denen wir hier den ersten Teil veröffentlichen, bezwecken, den Einfluß von mit Wasser verdünntem Serum, von Salzlösungen und anderen Agentien auf das phagocytäre Vermögen von Leukocyten quantitativ zu studieren. Ein derartiges Studium dürfte nicht nur Interesse beanspruchen, weil die Phagocytose als solche eine sehr wichtige Rolle im tierischen Organismus spielt — man denke nur an ihre von Metchnikoff ans Licht gebrachte und mit bewundernswertem Scharfsinn und Energie verteidigte Bedeutung im Kampf des Organismus gegen Mikroben[1] —, sondern auch weil diese Zellen ein so vorzügliches Objekt bilden für die Erforschung chemischer Einflüsse

---

[1]) Bemerkenswert in dieser Beziehung ist, was vor kurzem Metchnikoff über das Dürftige unserer Kenntnisse hervorhob in seinem, vor den Amsterdamer Studenten abgehaltenen Vortrag: „Reactions phagocytaires". „Nous ne sommes qu'au début. Lorsqu'on connaîtra mieux la physiologie des phagocytes (wir cursiviren), on cherchera des méthodes pour augmenter l'activité de ces éléments dans la lutte contre les microbes et on cherchera d'autres pour préserver contre l'attaque des phagocytes les cellules nobles de notre corps. En poursuivant ce but, il faudra tenir compte de ce que les phagocytes sont non seulement les destructeurs des microbes, mais qu'ils sont capables aussi de s'encorporer des poisons solubles et de les rendre inoffensifs. Leur rôle n'en devient que plus important."

auf lebendiges Protoplasma. Bilden diese Einflüsse ja im Grund Reaktionen, durch welche es schließlich gelingen muß, der chemischen Struktur des lebendigen Zelleninhaltes näher zu treten.

Die Methode bestand darin, daß wir weißen Blutkörperchen des Pferdes nach Versetzung in verschiedene Media die Gelegenheit gaben, Kohle in sich aufzunehmen und die Prozentzahl der Phagocytose zeigenden Zellen in den betreffenden Fällen ermittelten. Diese Prozentzahl war das Maß für den Grad der Phagocytose und gewährte einen Ausdruck für den Einfluß verschiedener Agentien auf die genannte Lebenstätigkeit. Es wurde dabei eine indifferente Substanz und keine Mikroorganismen genommen, weil im letzteren Falle die Verhältnisse viel komplizierter liegen. Daß wir Kohle wählten und nicht das gebräuchliche Karmin, hatte seinen Grund darin, daß eine Aufnahme von Kohle viel leichter und sicherer zu konstatieren ist. Eben deshalb hatte denn auch bereits früher der eine von uns bei seinen Untersuchungen über den Einfluß von CO_2 auf die Phagocytose [1]) Kohle den Vorzug gegeben.

2. Gewinnung der Leukocyten.

Die Methode, um Leukocyten aus Pferdeblut zu gewinnen, ist in der Hauptsache bereits früher an einer anderen Stelle beschrieben worden, sowie auch das Verfahren, um den Betrag der Phagocytose zu bestimmen [2]).

Es scheint aber empfehlenswert, die Technik hier etwas ausführlicher mitzuteilen, um so mehr, weil während der vorliegenden Untersuchungen noch kleinere Verbesserungen angebracht worden sind.

Das durch Aderlaß aus der V. Jugularis strömende Blut wird in mit Glasscherben beschickten Flaschen aufgefangen und so lange tüchtig geschüttelt, bis das Fibrin sich abgeschieden hat. Gewöhnlich genügen hierzu 10 Minuten. Das Fibrin mit den fast immer in demselben eingeschlossenen Glasscherben wird mittels Kolieren durch Gaze entfernt. Dann wird das Blut in hohe Zylindergläser gebracht und eine halbe bis eine ganze Stunde sich

---

[1]) Hamburger, Virchow's Archiv **156**, 329. Osmotischer Druck und Ionenlehre **1**, 416.

[2]) Hamburger, Virchow's Archiv a. a. O. Osmotischer Druck und Ionenlehre **1**, 401.

selbst überlassen. Nach dieser Zeit kann man drei Schichten unterscheiden. Die untere Schicht, welche ungefähr die Hälfte der ganzen Flüssigkeitssäule einnimmt, besteht hauptsächlich aus roten Blutzellen.

Auf dieser unteren, roten Schicht ruht eine sehr schmale weiße, welche fast ausschließlich aus weißen Blutzellen zusammengesetzt ist.

Die dritte und obere Schicht besteht aus einem trüben Serum, in welchem sehr viele rote und weiße Blutkörperchen enthalten sind.

Sie wird mittels einer mit Gummischlauch versehenen Pipette abgehoben. Das nämliche geschieht auch möglichst viel mit der zweiten Schicht. Es sei mit Nachdruck hervorgehoben, daß man mit der Absaugung der beiden obern Schichten nicht zu lange warten soll. Es senken sich sonst eine große Anzahl Leukocyten und bilden eine kompakte mittlere Schicht, welche schwierig abzuheben ist, was dann umsomehr zu bedauern ist, weil diese Schicht gerade so reich an Phagocyten ist. Offenbar besitzen die letzteren eine große Senkungsgeschwindigkeit. Wenn also die untere Schicht deutlich sich abzugrenzen anfängt, so ist es empfehlenswert, abzusaugen. Nach einiger Übung lernt man sehr bald den Zeitpunkt bestimmen, zu welcher man abpipettieren soll.

Jetzt wird die trübe Flüssigkeit einige Zeit zentrifugiert. Kräftiges und langes Zentrifugieren soll vermieden werden, weil sonst die Leukocyten zu sehr zusammenkleben. Für gewöhnlich genügte eine Umdrehung von 5 Minuten in einer Runneschen Wasserzentrifuge bei einer Tourenzahl von 600 bis 800 pro Minute, um die Formelemente auf den Boden der Röhrchen zu schleudern. Sollte das aber noch nicht vollständig erreicht sein und die obenstehende Flüssigkeit noch etwas trübe erscheinen, so kann man dieselbe doch ohne Beschwerde abheben, weil durch die große Senkungsgeschwindigkeit der Phagocyten von diesen Zellen nur wenige noch in der Flüssigkeit vorhanden sind. Jetzt wird das über dem Bodensatz stehende klare oder nahezu klare Serum zum größten Teil entfernt und das rückständige Serum durch hin- und herbewegen mit dem Bodensatze vermischt. Die auf diese Weise erhaltene Aufschwemmung kann nötigenfalls für die Experimente verwendet werden. Sie enthält aber immer noch viele Erythrocyten, die man besser tut möglichst zu entfernen, weil dieselben

sich bei der Zählung der Leukocyten in störender Weise geltend machen.

Zur Entfernung der roten Zellen fügt man die soeben erhaltene Suspension aus verschiedenen Zentrifugiergläsern zusammen und überläßt das Gemisch sich selbst während $^1/_2$ bis 1 Stunde. Es senken sich die roten Blutzellen zu Boden, während die Mehrzahl der Leukocyten in Suspension bleibt. Auf diese Weise hat man eine Flüssigkeit bekommen, in der sich wieder weniger rote Blutkörperchen befinden als vorher. Es liegt auf der Hand, daß man mit der Abpipettierung auch hier nicht zu lange warten darf, weil sonst zu viele weiße Blutkörperchen sich zu Boden senken.

Bei mikroskopischer Untersuchung der Suspension stellt sich heraus, daß drei Arten von Leukocyten vorhanden sind: 1. große Zellen mit großen Körnern (Mastzellen), 2. mittelgroße Zellen, 3. kleine Zellen (Lymphocyten). Nur die mittelgroßen sind phagocytär.

3. Die Kohle.

Für die Genauigkeit der Versuchsergebnisse ist die Feinheit der Kohle von hervorragender Bedeutung.

Sind viele gröbere Teilchen in den Präparaten zugegen, so ist eine genaue Zählung geradezu unmöglich. Sowohl die einzelnen Zellen wie auch ganze Konglomerate von Zellen werden dann oft dem Auge entzogen. Sind aber die Kohlenteilchen fein und in nicht zu großer Menge anwesend, so bereitet die Zählung der kohlenfreien ebenso wenig wie die der kohlenhaltigen einige Schwierigkeit. Am meisten geeignet sind Partikelchen etwa von der Größe von roten Blutkörperchen. Auf welche Weise kann man dieselben bekommen? Die käufliche Kohle ist zu grob, man muß also zerkleinern. Dabei haben wir eigentümliche Schwierigkeiten empfunden. Im gewöhnlichen Porzellanmörser schien eine genügende Feinheit von allen Teilchen nicht zu erreichen. Es wurde dann ein Achatmörmörser genommen und zwar mit anfänglichem Erfolg, aber bald stellte es sich heraus, daß die feinen Teilchen zusammenklebten und schließlich wieder große Partikelchen bildeten.

Endlich sind wir denn mittels folgenden Verfahrens zum Ziele gelangt.

Im gewöhnlichen Porzellanmörser wurde Holzkohle möglichst fein zerrieben und dann auf ein Blatt schwarzes Glanzpapier ge-

bracht, in dem mittels einer feinspitzigen Nadel feine Löcher gestochen waren. Durch Hin- und Herbewegen fielen die kleinsten Partikelchen hindurch. Es waren aber unter diesen manche, welche noch zu große Dimensionen hatten. Deshalb wurde die durchgesiebte Masse in einen mit Wasser gefüllten Glaszylinder gebracht und geschüttelt. Nachdem die Aufschwemmung während 2 Minuten sich selbst überlassen war, hatten sich die gröbsten Teichen zu Boden gesetzt und wurde die auf dem Bodensatz sich befindende Suspension abpipettiert, in ein anderes Zylinderglas übergebracht und eine halbe Stunde sich selbst überlassen. Während dieser Zeit hatten die gröberen Partikelchen die Gelegenheit sich abzusetzen und konnte nachher die nunmehrige Aufschwemmung entfernt werden. Diese enthielt fast nur Teilchen von der erwünschten Feinheit. Um dieselben als trockenes Pulver zur Verfügung zu haben, wurde die letzerhaltene Suspension in ein neues Zylinderglas gebracht, 12 Stunden sich selbst überlassen, dann das Wasser abpipettiert, der Bodensatz getrocknet und in einem trockenen Porzellanmörser zerrieben. Die auf diese Weise zubereitete Kohle eignete sich zu unserem Zwecke ganz vorzüglich. Um nachheriges Zusammenkleben der Partikelchen vorzubeugen, ist es notwendig, die Kohle trocken aufzubewahren. Fügen wir noch hinzu, daß wir Holzkohle verwendeten und keine Knochenkohle, weil erstere viel leichter ist, dementsprechend viel länger in der Leukocytensuspension suspendiert bleibt und deswegen eine bessere Berührung mit den Leukocyten gewährt.

4. Versuchsverfahren.

Nachdem die Leukocyten eine gewisse Zeit der Einwirkung der zu untersuchenden Flüssigkeit bei 37° ausgesetzt gewesen sind, wird zu 3 ccm der nunmehrigen Suspension die Kohle hinzugesetzt, welche sich in einem Glasnäpfchen[1]) leicht abmessen läßt, und diese mit der Flüssigkeit gleichmäßig vermischt. Wir verwendeten zylindrische mit Glasstöpseln versehene Flaschen von etwa 2 ccm Diameter. Es wurde jede 10 Minuten die Flaschen aus dem Brutschrank ge-

[1]) Dasselbe wurde in der Weise hergestellt, daß ein Glasstab in der Flamme etwas ausgezogen wurde und in das verjüngte Ende, während es durch abermalige Erhitzung erweicht war, mittels eines dünnen Eisenstäbchens eine kleine Dalle gedrückt wurde. Der Inhalt unseres Näpfchens betrug etwa 0.05 ccm.

nommen und vorsichtig hin- und herbewegt um eine möglichst gleichmäßige Mischung und Berührung von Leukocyten und Kohle zu erzielen. Im ganzen verweilten die Flaschen $^{1}/_{2}$ Stunde im Brutschrank. Nachdem wurden sie alle zu gleicher Zeit an einem kühlen Ort (Keller) hingestellt. Hinstellen auf Eis ist abzuraten, weil bei diesem raschen kräftigen Temperaturwechsel, wie es sich gezeigt hat, Leukocyten zu Grunde gehen, vielleicht wegen zu schroffer Kontraktionen. Eine oder mehrere Stunden nachher werden mikroskopische Präparate angefertigt. Hierzu ist es notwendig, die Aufschwemmung erst gut zu bewegen; denn insbesondere die mit Kohle beladenen Phogocyten senken sich leicht zu Boden. Am besten erreicht man eine gleichmäßige Verteilung wenn man den ganzen Inhalt des zylindrischen Glasgefäßes in eine Kugelpipette aufsaugt und diese in geeigneter Weise hin- und herbewegt. Die Kugelpipette hat die Gestalt der dem Zählapparat von Zeiß-Malasetz gehörenden Blutpipette; auch hier befindet sich ein Glasperle im kugelförmigen Raum. Dieser enthält 3 ccm, während noch hinzuzufügen ist, daß der obere Teil eine Verengerung trägt, wie gebräuchlich bei den Pasteurschen Pipetten.

Nach dem Schütteln läßt man den geringfügigen Inhalt des unteren ausgezogenen Glasrohres der Pipette auslaufen und was dann nachkommt, ist zur Anfertigung von mikroskopischen Präparaten geeignet.

Die Resultate, die man auf diese Weise bekommt, sind im allgemeinen genauer, als wenn man aus dem hin- und herbewegten Zylinder mittels einer gewöhnlichen Pipette einen Tropfen aushebt. Es möge dies aus den beiden folgenden Tabellen hervorgehen.

Aus dem Cylindergläschen ist nach Hin- und Herbewegen ein Tropfen der zu untersuchenden Aufschwemmung genommen.

Aufschwemmungen	Totalanzahl der gezählten Leukocyten	Anzahl derjenigen Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben	Prozentzahl derjenigen Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben
1 ccm Leukocyten-Serum. Suspension + 2 ccm Serum . .	246	50	20 %
1 ccm desgl.	308	74	24 %
1 ccm desgl.	240	42	17,5 %

Man darf nicht sagen, daß die Zahlen der letzteren Spalten in schöner Weise stimmen.

Viel besser ist die Übereinstimmung der Zahlen, wo der Inhalt der Zylindergläschen in Kugelpipetten übergebracht wurde und aus den Kugelpipetten ein Tropfen genommen zur Anfertigung des mikroskopischen Präparates war.

Der Inhalt der Zylindergläschen in Kugelpipetten aufgesogen, darin geschüttelt und von dem Inhalt mikroskopische Präparate angefertigt.

Aufschwemmungen	Totalanzahl der gezählten Leukocyten	Anzahl derjenigen Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben	Prozentzahl derjenigen Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben
1 ccm Leukocytenaufschwemmung + 2 ccm Serum	600	138	23 %
1 ccm desgl.	448	98	21,9 %
1 ccm desgl.	764	174	22,8 %

Diese und ähnliche Resultate haben Veranlassung gegeben, weiterhin auch die Einwirkung der Phagocyten-Aufschwemmungen auf die Kohle in den Kugelpipetten stattfinden zu lassen. Selbstverständlich waren die unteren Spitzen zugeschmolzen. Bei diesem Verfahren war es nun weiter leicht, das Bewegen der Gefäße jede 10 Minuten zu umgehen, indem die Kugelpipetten im Brutschrank mechanisch rundgedreht wurden.

Es wurde dann schließlich in folgender Weise experimentiert.

Zunächst wird die zu untersuchende Flüssigkeit zu der Leukocyten-Suspension hinzugesetzt und das Gemisch einige Zeit sich selbst bei Körpertemperatur überlassen, um die Zellen dem Einfluß des neuen Mediums auszusetzen. Dann wird Kohle hinzugefügt, nach guter Verteilung die ganze Aufschwemmung in die von einer Glasperle versehenen Kugelpipete aufgesaugt und diese an der unteren ausgezogenen Spitze zugeschmolzen. Weiter werden alle Kugelpipetten der Versuchsreihe auf eine in einem Brutofen sich befindende drehbare Achse befestigt, welche mittels eines Heinrici-Heißluftmotor bewegt wird. Der Heißluftmotor wirkt an einer Scheibe, die außerhalb des Kastens an die genannte dreh-

bare Achse verbunden ist. Eigentlich sind mehrere Scheiben angebracht worden, um den Einfluß der großen Tourenzahl des Motors zu lindern. Das ist notwendig, weil sonst die Kohlepartikelchen an die Phagocyten zu schnell vorübergehen und dadurch die Kohleaufnahme beeinträchtigt wird. Mit einer langsamen Drehung erzielt man eine erwünschte gleichmäßige Durchmischung. Nachdem die Pipetten eine Stunde bei Körpertemperatur im Brutschrank verweilt haben, werden sie aus den an die Achse gelöteten Hülsen herausgenommen, in einen kühlen Raum gelegt, um etwaiger weiterschreitender Phagocytose Einhalt zu tun und werden nach erneuter Bewegung, Eröffnung der zugeschmolzenen Spitze und Ablaufen der ersten Tropfen, mikoskropische Präparate angefertigt. Die Präparate werden in Paraffinleistchen eingekittet.

Die Zählung erfolgt mittels Okularnetzmikrometers und verschiebbarem Objekttisch.

Wie sich durch Vorversuche herausgestellt und sich noch bei den unten zu erwähnenden Versuchen gezeigt hat, giebt die Methode ganz zuverlässige Resultate.

5. Kritik der Methode.

Es kann die Frage erhoben werden, ob man wirklich berechtigt ist, als Maß für die Phagocytose, statt der Aufnahmefähigkeit jeder einzelnen Phagocyt die Prozentzahl derjenigen Leukcoyten anzunehmen, welche Kohle aufgenommen haben. (Vergl. S. 89.)

Zunächst wäre darauf zu antworten, daß, wie es auf der Hand liegt, daß nicht alle in einer Suspension vorhandenen Phagocyten in gleichem Grade befähigt sind, phagocytäres Vermögen zu entfalten. Es kann das im Alter und in der Herkunft der einzelnen Zellen oder auch in anderen physiologischen Bedingungen gelegen sein. Stellen wir uns nun vor, daß in einer Aufschwemmung eine gewiße Anzahl Phagocyten vorhanden sind, die während der Zeit daß sie mit Kohle in Berührung waren, noch gerade ein Partikelchen davon aufnehmen konnten, so werden diese Zellen das nicht alle tun, wenn sie später in einem Medium zu liegen kommen, das das phagocytäre Vermögen aller Phagocyten ein wenig herabsetzt. In letzterer Flüssigkeit wird man also eine geringere Anzahl kohlehaltiger Phagocyten zählen. Noch kleiner wird die betreffende Zahl sein, wenn Flüssigkeit genommen wird, welche das phagocytäre Vermögen noch mehr herabsetzt; denn es werden dann

nicht die soeben genannten schwächsten Phagocyten unwirksam gemacht, sondern auch die, welche jenen in phagocytärer Kraft etwas überlegen waren, usw. Hieraus geht hervor, daß man in der Tat berechtigt ist, die Prozentzahl derjenigen Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben, als Maß für die Phagocytose anzusehen.

Indessen ist diese Schlußfolgerung nur wichtig unter der Bedingung, daß das neue zu untersuchende Medium die Gesamtzahl der Leukocyten unverändert läßt. Denken wir uns einen Augenblick den Fall, daß eine gewisse Anzahl der zur Kohlenaufnahme niemals fähigen Leukocyten, z. B. Lymphocyten, durch Einwirkung des neuen Mediums zu Grunde gegangen ist, so wird wenn die absolute Anzahl der kohlehaltigen Leukocyten dieselbe geblieben ist, die Prozentzahl der Phagocytose doch größer ausfallen. Im allgemeinen kann man sagen, daß ein Agens, welches mehr Lymphocyten als Phagocyten zerstört, die prozentische Phagocytose zu groß erscheinen lassen wird, während ein Agens, das mehr Phagocyten als Lymphocyten zerstört, die prozentische Phagocytose zu klein erscheinen lassen wird. Nur im Falle, daß kein einziges Leukocyt zerstört wird, oder auch im Fall die Phagocyten in gleichem prozentischen Grade wie die Nicht-Phagocyten zu Grunde gehen, findet der Einfluß des zu untersuchenden Mediums einen zuverlässigen Ansdruck in der Prozentzahl der kohlehaltigen Leukocyten.

Nun kann man schwerlich kontrolieren, ob die in einer Aufschwemmung vorhandenen Phagocyten und Nicht-Phagocyten in gleichem prozentischen Grade zerstört werden. Die Methode ist also in der angegebenen Richtung nur in quanitativem Sinne brauchbar, falls das Agens keine Zelle in der Weise zerstört, daß sie sich der Zählung entzieht.

Darüber muß man Sicherheit haben. Es ist also die Regel aufzustellen, daß man bei der Untersuchung des Einflusses eines neuen Mediums bezw. Agens auf die Phagocytose erst ermittele, ob die Gesamtzahl der Leukocyten nach der Einwirkung des neuen Mediums unverändert bleibt. Nur in diesem Falle ist die Methode zuverlässig und gewährt die Änderung der Prozentzahl der kohlehaltigen Leukocyten ein zuverlässiges Maß für den untersuchten Einfluß. Wie sich unten (S. 100) herausstellen wird, haben wir die betreffenden Untersuchungen für den hier zu erforschenden Einfluß von Wasserzusatz auf die Phagocytose auch ausgeführt.

6. Versuche.

A. Inwieweit macht sich die Wasserverdünnung des Blutserums auf die Phagocytose geltend?

Früher hatte der eine von uns gefunden, daß die roten Blutkörpchen eine bedeutende Wassermenge aufzunehmen imstande sind, ohne dabei Farbstoff zu verlieren[1]). Beim Menschen, beim Pferd und bei andern großen Säugetieren, konnte das Serum mit etwa 60 % Wasser verdünnt werden, ohne daß die roten Blutkörperchen Farbstoff an die Umgebung abzugeben anfingen. Fügt man mehr Wasser hinzu, so gibt es eine gewiße Anzahl, die ihr Hämoglobin verlieren. Je mehr Wasser man hinzusetzt, destomehr rote Zellen gehen zu Grunde.

Es war nun die Frage, geht mit dem Anfang von Farbstoffaustritt bei den roten Blutkörperchen auch ein Anfang von Abnahme des phagocytären Vermögens bei den weißen Blutkörperchen parallel, m. a. W. wird man das Serum gleichfalls mit mehr als 60 % Wasser zu verdünnen haben, bevor die Phagocytose in nachteiliger Weise beeinflußt wird. Diese Frage erschien auch deshalb nicht unberechtigt, weil ebenso wie die roten auch die weißen Blutzellen in wasserververdünntem Serum quellen, ja selbst ist die prozentische Volumzunahme genau die gleiche[2]) ist.

Es war also möglich, daß durch ein wenig mehr als 60 % Wasser ein Teil der Leukocyten ihren farblosen Inhalt und dementsprechend ihr phagocytäres Vermögen verlieren würden; oder würde eine Abnahme des phagocytären Vermögens sich bereits bei einem weniger als mit 60 % wasserverdünnten Serum geltend machen?

Es wurden also die folgenden Gemische nach dem bereits angebenen Verfahren untersucht:

1.	1 ccm d. Leukocytensuspension	+ 2 ccm Serum	
2.	1 „ „ „	+ 1 1/2 „ „	+ 1/2 ccm Wasser
3.	1 „ „ „	+ 1 „ „	+ 1 „ „
4.	1 „ „ „	+ 1/2 „ „	+ 1 1/2 „ „
5.	1 „ „ „	+ 1/4 „ „	+ 1 3/4 „ „
6.	1 „ „ „	+ 0 „ „	+ 2 „ „

[1]) Hamburger, Sitzungsber. der Koninkl. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam 26. März 1885; Osmotischer Druck und Ionenlehre 1, 184.

[2]) Hamburger, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1898, S. 317; Osmotischer Druck und Ionenlehre 1, 339.

Es wurden also zu je 100 ccm (Leukocyten-Suspension + Serum) hinzugefügt: 0 ccm, 20 ccm, 50 ccm, 100 ccm, 140 ccm und 200 ccm Wasser. Das Serum ist somit verdünnt mit 0 %, 20 %, 50 %, 100 %, 140 % und 200 % Wasser.

Bei dieser Berechnung ist angenommen, daß in 1 ccm Leukocyten-Serumsuspension auch 1 ccm Serum vorhanden war. Das ist natürlich nicht richtig, denn es nehmen ja die Formelemente selbst auch einen gewissen Raum ein. Es stellte sich jedoch beim Zentrifugieren der Suspension heraus, daß das Volumen der Formelemente gegenüber dem Volumen des Serums ein so geringes war, daß man praktisch keinen Fehler macht, wenn man in obiger Weise rechnet.

Die folgende Tabelle enthält die Resultate der Versuche mit den sechs Aufschwemmungen.

	Serum, verdünnt mit % Wasser	Anzahl der untersuchten Leukocyten	Anzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben	Prozentzahl derjenigen, Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben.
1	0 %	886	331	37 %
2	20 %	754	246	32 %
3	50 %	732	154	21 %
4	100 %	636	81	$12\frac{1}{2}$ %
5	140 %	530	0	0 %
6	200 %	546	0	0 %

Man sieht, daß bereits durch die Hinzufügung von 20 % Wasser zu dem Serum die prozentische Anzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben, um $\frac{37-32}{37} \times 100 = 13{,}5\,\%$ kleiner geworden ist und daß diese Abnahme bei weiterer Hinzugabe von Wasser zunimmt.

Es stellt sich heraus, daß Hinzufügung von 140 % Wasser, die Phagocyten dermaßen geschädigt hat, daß keiner zur Aufnahme von Kohle mehr fähig ist. Es verdient noch Erwähnung, daß in Nummer 1 die kohlehaltigen Zellen, größenteils vollständig mit dieser Substanz angefüllt waren. Fast dasselbe Bild zeigten die Präparate der Nummer 2. In den Zellen der Nummer 3 und namentlich in den der Nummer 4 war entschieden weniger Kohle vorhanden als in den der Nummer 1.

Also äußert sich der Einfluß der Wasserzugabe zu dem Serum nicht nur darin, daß der Prozentgehalt der weißen Blutkörperchen, welche noch Kohle aufzunehmen imstande ist, kleiner

wird, sondern auch darin, daß von jeder einzelnen Zelle das phagocytäre Vermögen beeinträchtigt worden ist. Es ist das ganz im Einklang mit dem, was wir unter 5 über die Grundlage der Methode ausgeführt haben.

Man wird anerkennen müssen, einerseits, daß das phagocytäre Vermögen der Leukocyten gegenüber Wasserzusatz sehr empfindlich ist, andererseits, daß viele unter den Phagocyten eine große Wassermenge vertragen, ohne das phagocytäre Vermögen einzubüßen.

Wir führen noch eine zweite Versuchsreihe an. Die Experimente wurden in derselben Weise angestellt.

	Serum, verdünnt mit % Wasser	Anzahl der untersuchten Leukocyten	Anzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben.	Prozentzahl derjenigen Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben
1	0 %	685	92	13,2 %
2	20 %	608	72	11,8 %
3	50 %	683	55	8 %
4	100 %	738	42	5,7 %
5	140 %	—	sehr wenige	0 %
6	200 %	—	0	0 %

Man sieht, das Resultat ist genau dasselbe wie in der vorigen Tabelle.

So stellt sich z. B. heraus, daß Zusatz von 20% Wasser das phagocytäre Vermögen um $\frac{13,2-11,8}{13,2} \times 100 = 10\%$ herabgesetzt hat.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß das Serum bereits bei einer geringen Wasserverdünnung, Abnahme des phagocytären Vermögens herbeiführt. Eine Abnahme des osmotischen Druckes um z. B. 5%, also eine Depressionsabnahme des Blutserums von — $0,58\% \times \frac{5}{100} = 0,029\%$, würde dementsprechend das phagocytäre Vermögen um etwa $\frac{5}{20} \times 10\% = 2,5\%$ herabsetzen müssen.

Indessen kann, wie bei den kritischen Betrachtungen sub 5 hervorgehoben wurde, den gefundenen Zahlenwerten über den Grad der Phagocytose, nur dann völlige Zuverlässigkeit beigemessen werden, wenn festgestellt worden ist, daß die Einwirkung der ver-

Es wurden also zu je 100 ccm (Leukocyten-Suspension + Serum) hinzugefügt: 0 ccm, 20 ccm, 50 ccm, 100 ccm, 140 ccm und 200 ccm Wasser. Das Serum ist somit verdünnt mit 0 %, 20 %, 50 %, 100 %, 140 % und 200 % Wasser.

Bei dieser Berechnung ist angenommen, daß in 1 ccm Leukocyten-Serumsuspension auch 1 ccm Serum vorhanden war. Das ist natürlich nicht richtig, denn es nehmen ja die Formelemente selbst auch einen gewissen Raum ein. Es stellte sich jedoch beim Zentrifugieren der Suspension heraus, daß das Volumen der Formelemente gegenüber dem Volumen des Serums ein so geringes war, daß man praktisch keinen Fehler macht, wenn man in obiger Weise rechnet.

Die folgende Tabelle enthält die Resultate der Versuche mit den sechs Aufschwemmungen.

	Serum, verdünnt mit % Wasser	Anzahl der untersuchten Leukocyten	Anzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben	Prozentzahl derjenigen, Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben.
1	0 %	886	331	37 %
2	20 %	754	246	32 %
3	50 %	732	154	21 %
4	100 %	636	81	12½ %
5	140 %	580	0	0 %
6	200 %	546	0	0 %

Man sieht, daß bereits durch die Hinzufügung von 20 % Wasser zu dem Serum die prozentische Anzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben, um $\frac{37-32}{37} \times 100 = 13{,}5\,\%$ kleiner geworden ist und daß diese Abnahme bei weiterer Hinzugabe von Wasser zunimmt.

Es stellt sich heraus, daß Hinzufügung von 140 % Wasser, die Phagocyten dermaßen geschädigt hat, daß keiner zur Aufnahme von Kohle mehr fähig ist. Es verdient noch Erwähnung, daß in Nummer 1 die kohlehaltigen Zellen, größenteils vollständig mit dieser Substanz angefüllt waren. Fast dasselbe Bild zeigten die Präparate der Nummer 2. In den Zellen der Nummer 3 und namentlich in den der Nummer 4 war entschieden weniger Kohle vorhanden als in den der Nummer 1.

Also äußert sich der Einfluß der Wasserzugabe zu dem Serum nicht nur darin, daß der Prozentgehalt der weißen Blutkörperchen, welche noch Kohle aufzunehmen imstande ist, kleiner

wird, sondern auch darin, daß von jeder einzelnen Zelle das phagocytäre Vermögen beeinträchtigt worden ist. Es ist das ganz im Einklang mit dem, was wir unter 5 über die Grundlage der Methode ausgeführt haben.

Man wird anerkennen müssen, einerseits, daß das phagocytäre Vermögen der Leukocyten gegenüber Wasserzusatz sehr empfindlich ist, andererseits, daß viele unter den Phagocyten eine große Wassermenge vertragen, ohne das phagocytäre Vermögen einzubüßen.

Wir führen noch eine zweite Versuchsreihe an. Die Experimente wurden in derselben Weise angestellt.

	Serum, verdünnt mit % Wasser	Anzahl der untersuchten Leukocyten	Anzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben.	Prozentzahl derjenigen Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben
1	0 %	685	92	13,2 %
2	20 %	608	72	11,8 %
3	50 %	683	55	8 %
4	100 %	738	42	5,7 %
5	140 %	—	sehr wenige	0 %
6	200 %	—	0	0 %

Man sieht, das Resultat ist genau dasselbe wie in der vorigen Tabelle.

So stellt sich z. B. heraus, daß Zusatz von 20% Wasser das phagocytäre Vermögen um $\frac{13,2-11,8}{13,2} \times 100 = 10\%$ herabgesetzt hat.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß das Serum bereits bei einer geringen Wasserverdünnung, Abnahme des phagocytären Vermögens herbeiführt. Eine Abnahme des osmotischen Druckes um z. B. 5%, also eine Depressionsabnahme des Blutserums von $-0,58\% \times \frac{5}{100} = 0,029\%$, würde dementsprechend das phagocytäre Vermögen um etwa $\frac{5}{20} \times 10\% = 2,5\%$ herabsetzen müssen.

Indessen kann, wie bei den kritischen Retrachtungen sub 5 hervorgehoben wurde, den gefundenen Zahlenwerten über den Grad der Phagocytose, nur dann völlige Zuverlässigkeit beigemessen werden, wenn festgestellt worden ist, daß die Einwirkung der ver-

dünnten serösen Flüssigkeiten die Gesamtzahl der zählbaren Leukocyten unverändert läßt.

Wir haben diese Angelegenheit untersucht, indem wir Gemische von 1 cc Leukocytensuspension und 2 cc Serum von verschiedenen Verdünnungen anfertigten und von jedem Gemisch einen Tropfen auf den Objektträger des Blutkörperchenzählapparates von Thoma-Zeiss brachten. Nachdem der Tropfen mit einem Deckgläschen bedeekt war, wurde etwa eine Viertelstunde gewartet bis die weißen Zellen sich gesenkt hatten und dann gezählt.

Man ersieht die Resultate in der folgenden Zusammenstellung, in die auch einige mikroskopische Befunde aufgenommen worden sind.

	Serum, verdünnt mit % Wasser	Gesamtanzahl Leukocyten in 200 Quadraten	Mikroskopische Beobachtungen
1	0 %	163	Bloß normale rote und weiße Blutkörper.
2	20 %	169	Wie in (1).
3	50 %	159	Wie in (1).
4	700 %	166	Einige Leukocyten sind umgeben von offenbar ausgestoßenem, gekörntem Inhalt. Diese Leukocyten zeigen auch kleine und große scharf umschriebene runde Löcher (Vakuolen). Anzahl Erythrocyten kleiner als in (1), (2) und (3).
5	100 %	158	Mehr Leukocyten als in (4), haben Inhalt verloren. Anzahl Erythrocyten klein.
6	200 %	160	Noch viel mehr Leukocyten als in (5) haben Inhalt ausgestoßen. Fast alle zeigen kleine und große runde Löcher. Kein einziges rotes Blutkörperchen mehr zu beobachten.

Aus diesen Versuchen erhellt:

1. nach Einwirkung von wasserverdünntem Serum sind alle Leukozyten noch zu beobachten; alle können also in die Zählung begriffen werden, so mit auch diejenigen, welche in Folge starker Wasseraufnahme und Quellung ihren Inhalt ganz oder teilweise verloren haben;
2. der Inhaltsverlust kann noch nicht konstatiert werden, wenn die Verdünnung des Serums bereits auf etwa 50% ge-

stiegen ist. Bei einer Verdünnung mit 70% Wasser verliert ein Teil der Leukocyten körnigen Inhalt. Je mehr die Verdünnung fortschreitet, desto mehr Leukocyten verlieren von ihrem Inhalt. Bei Verdünnung mit 200% Wasser scheint wohl die Mehrzahl Leukocyten den Inhalt ganz oder teilweise ausgestoßen zu haben;

3. die ersten Leukocyten fangen Inhalt auszustoßen an bei ungefähr derselben Verdünnung, bei der auch die zugleich vorhandenen roten Blutkörperchen ihren Inhalt abzugeben anfangen;
4. In derselben Verdünnung, bei welcher alle roten Blutkörperchen zerstört werden, scheint noch eine große Anzahl Leukocyten morphologisch unversehrt zu bleiben.

Auf die Vergleichung zwischen dem Verhalten von roten und weißen Blutkörperchen kommen wir unten noch zurück. Was uns vorläufig am meisten interessiert, ist das sub 1 genannte Resultat. Denn nach diesem ist nunmehr in einwandfreier Weise nachgewiesen, daß die für den Einfluß des Wasserzusatzes auf die Phagocytose gefundenen Zahlenwerte vollkommen zuverlässig sind. Festgestellt ist somit, daß die Abnahme der Phagocytose bereits bei einer geringen Wasserzugabe anfängt, und zwar bei einer Zugabe, bei der weder von Zerstörung von weißen noch von Zerstörung von roten Blutkörperchen die Rede ist.

Bei näherer Betrachtung kann dieses Resultat nicht befremden, denn Inhaltaustritt aus den weißen und Farbstoffaustritt aus roten Blutkörperchen bedeutet eine Zerstörung der betreffenden Zellen, also Vernichtung der Lebenstätigkeit, während Verminderung des phagocytären Vermögens bloß ein Ausdruck herabgesetzter Lebenstätigkeit ist.

Aus diesem Gesichtspunkt war es von Interesse zu untersuchen, ob das herabgesetzte phagocytäre Vermögen, durch Zurückbringung der Zellen in das ursprüngliche, unverdünnte Serum wiederhergestellt werden konnte.

B. Inwieweit kann das durch Wasserzusatz herabgesetzte phagocytäre ermögen wiederhergestellt werden?

Um diese Frage zu beantworten, wurde 1 ccm einer Leukocyten-Serum-Suspension versetzt mit:

a) 2 ccm des eigenen Serums.
b) 2 ccm eines Gemisches von 1½ ccm Serum + ½ ccm Wasser.
c) 2 ccm eines Gemisches von 1 ccm Serum + 1 ccm Wasser.
d) 2 ccm eines Gemisches von ½ ccm Serum + 1½ ccm Wasser.
e) 2 ccm eines Gemisches von 0 ccm Serum + 2 ccm Wasser.

Die Suspensionen a, b, c, d und e sind also verdünnt bezw. mit 0 %, 20 %, 50 %, 100 % und 200 % Wasser.

Alle 5 Suspensionen wurden 1 Stunde sich selbst überlassen und dann zentrifugiert. Nachdem die klaren Flüssigkeiten abgehoben waren, wurden die Bodensätze mit 3 ccm des ursprünglichen Serums versetzt und darin verteilt. Endlich wurden die nunmehr erhaltenen Suspensionen mit Kohle vermischt und in der gewöhnlichen Weise untersucht.

Die folgende Tabelle enthält die Resultate.

	Serum, verdünnt mit % Wasser	Anzahl der untersuchten Leukocyten	Anzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben	Prozentzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben
a)	0 %	536	96	17,9 %
b)	20 %	625	110	17,6 %
c)	50 %	528	96	18,2 %
d)	100 %	503	66	13,1 %
e)	200 %	740	76	10,3 %

Aus diesen Versuchsergebnissen geht hervor:

1. daß, wenn man die Leukocyten einem Serum aussetzt, das mit 20 % Wasser verdünnt ist, eine Quantität, welche nach den vorigen Versuchen das phagocytäre Vermögen bedeutend beeinträchtigt[1]), letzteres nach Zurückbringung der Zellen in das normale unverdünnte Serum, vollständig wiederhergestellt wird,
2. daß das Gleiche der Fall ist, wenn das Serum mit 50 % Wasser versetzt worden war,
3. daß aber Hinzufügung von 100 % Wasser eine bleibende Verminderung des phagocytären Vermögens zurückläßt,
4. daß nach Hinzufügung von 200 % die bleibende Verminderung des phagocytären Vermögens bedeutender ist als nach Znsatz von 100 % Wasser.

[1]) Er wäre vielleicht eleganter gewesen, auch diesen Versuch und die entsprechenden mit größerem Wasserzusatz in die Reihe aufzunehmen; es wurde aber darauf verzichtet weil es beschwerlich ist, viele Experimente zu gleicher Zeit anzustellen. Die Zählungen nehmen zu viel Zeit in Anspruch.

Insbesondere verdient das sub 4 genannte Resultat die Aufmerksamkeit. Denn, wie aus den früheren Experimenten hervorgeht, zeigen die Leukocyten, welche in mit 200% wasserverdünntem Serum liegen, absolut kein phagocytäres Vermögen mehr. Im vorliegenden Versuche stellt sich aber heraus, daß durch Ersetzung dieses verdünnten Serums durch normales, viel mehr als die Hälfte der Phagocyten ihr Vermögen Kohle aufzunehmen, wieder zurückgewonnen haben.

Weiter lehren die sub 1 und 2 hervorgehobenen Resultate, daß die Phagocyten eine große Wassermenge ertragen können, bevor sie das Leben einbüßen; kann ja das umgebende Serum mit mehr als 50% Wasser verdünnt werden, bevor das Leben sogar der am wenigsten resistenten Leukozyten gefährdet wird. Bei den roten Blutkörperchen nimmt man eine ähnliche Erscheinung wahr. Denn auch die in mit 50% Wasser verdünntem Serum zu Kugeln gequollenenen Erythrocyten, nehmen nach Zurückbringen in normales Serum ihre frühere Scheibenform wieder an, legen sich sogar wieder in Geldrollen. Ob auch bei den roten Blutkörperchen, so lange sie in verdünntem Serum liegen, die Lebenstätigkeit herabgesetzt ist, wie es sich hier für die Phagocyten herausgestellt hat, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, da ein für das Experiment zugängliches Lebensmerkmal bei diesen roten Zellen bis jetzt unbekannt ist. Wahrscheinlich ist es wohl, denn die Erfahrung lehrt, daß die in mäßig (z. B. mit 30% Wasser) verdünntem Serum suspendierten Blutkörperchen sich beim sterilen Aufbewahren nicht so lange halten, wie die in unverdünntem Serum suspendierten, m. a. W., die ersteren fallen schneller der spontanen Hämolyse anheim.

Wir führen hier noch eine zweite Versuchsreihe in derselben Richtung an.

	Serum, verdünnt mit 0 % Wasser	Anzahl der untersuchten Leukocyten	Anzahl der Leukocyten welche Kohle aufgenommen haben	Prozentzahl der Leukocyten, welche Kohle aufgenommen haben
1	0 %	500	105	21 %
2	20 %	500	99	19,8 %
3	50 %	500	107	21,4 %
4	70 %	500	96	19,2 %
5	100 %	500	78	15,6 %
6	200 %	500	61	12,2 %

Diese Versuchsreihe führt zu ganz demselben Resultat wie die auf S. 102 mitgeteilten. Nur sei darauf aufmerksam gemacht, daß hier auch der Einfluß einer Verdünnung mit 70% Wasser untersucht worden ist und doch dieselbe eine, wenn auch geringfügige, bleibende Verringerung des gesamtphagocytären Vermögens, also eine Zerstörung eines kleinen Teils der Phagocyten, herbeigeführt hat.

C. Vergleichende Betrachtungen über die Resistenz von Phagocyten und von roten Blutkörperchen gegenüber Wasserzusatz.

Bereits früher hat der eine von uns bei verschiedenen Gelegenheiten, auf die Übereinstimmung zwischen weißen und roten Blutkörperchen hingewiesen. So stellte sich heraus: 1. daß die beiden Zellenarten durch hyperisotonische Lösungen schrumpfen und durch hypisotonische quellen; 2. daß die prozentische Schrumpfung und Quellung durch dieselbe Salzlösung bei beiden Zellenarten dieselbe war [1]), eine Erscheinung, welche zu der Schlußfolgerung führte, daß in beiden das prozentische Volum des Gerüstes das gleiche sein mußte; 3. veranlaßt Hinzufügung von CO_2 [2]) und von geringen Mengen anderer Säuren [3]) bei beiden Zellenarten Schwellung, Hinzufügung von Alkohol dagegen Schrumpfung.

Wie ist es nun mit der Resistenz der beiden Zellenarten gegenüber Wasserzusatz? Besteht auch in dieser Hinsicht völlige Übereinstimmung? Mit anderen Worten, kann ein Phagocyt dieselbe Wassermenge ertragen ohne zerstört zu werden, wie ein rotes Blutkörperchen? Aus den obigen Untersuchungen geht bereits hervor, daß nicht alle Phagocyten derselben Suspension die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Wasser besitzen. Man kann also ebenso wie bei den Erythrocyten auch bei den Phagocyten von Minimum- und Maximumresistenz sprechen. Bekanntlich wird bei den roten Blutkörperchen als Minimumresistenz angegeben die schwächste Salzlösung oder stärkste Serumverdünnung,

---

[1]) Hamburger, Archiv f. (Anat.) u. Physiol. **1898**, 317; Osmotischer Druck und Ionenlehre **1**, 339.

[2]) Hamburger, Ztschr. f. Biolog. **35**, 280. 1897; Osmotischer Druck und Ionenlehre **1**, 404.

[3]) Hamburger, Archiv f. (Anat.) u. Physiol. **1898**, 31; Osmotischer Druck und Ionenlehre **1**, 418.

welche die Blutkörperchen noch ertragen, ohne Farbstoff zu verlieren und als Maximumresistenz die Salzlösung oder Serumverdünnung, welche fast alle Blutkörperchen zerstört, also auch diejenigen, welche die größte Wassermenge ertragen können. Die Maximumresistenz wird also durch eine schwächere Salzlösung angegeben als die Minimumresistenz. Den Unterschied beider Konzentrationen nennt man Resistenzbreite. Bei den Erythrocyten ist die Ermittelung der beiden Resistenzwerte gegenüber Wasserzusatz zu dem Medium sehr einfach und scharf, insbesondere die Minimumresistenz. Sobald ein kleiner Teil der roten Blutkörperchen zugrunde gegangen ist, zeigt sich das durch eine Rotfärbung des Mediums an. Selbstverständlich kann ein ähnliches Merkmal bei den weißen Blutkörperchen nicht benutzt werden. Zwar kann man durch mikroskopische Beobachtung konstatieren, ob neben einer Leukocyt eine kleinere oder größere Anhäufung von gekörnter Masse sich befindet, was wohl auf einen Inhaltsverlust hindeutet, welcher dem Farbstoffverlust bei den Erythrocyten an die Seite steht, aber zu quantitativen Zwecken kann dieses Merkmal nicht benutzt werden. Zunächst, weil bei der Anfertigung des Präparates die ausgestoßene Masse sich leicht von der Zelle entfernen kann, zweitens, weil nicht selten ein Austritt von Inhalt überhaupt kaum mikroskopisch wahrzunehmen ist. Aus welchem Grund das der Fall ist, können wir augenblicklich ebensowenig erklären wie die Tatsache, daß zuweilen im wasserverdünnten Serum fast alle Leukocyten große Vakuolen zeigen, während in anderen Fällen nur bei großer Aufmerksamkeit bloß kleine Vakuolen sichtbar sind.

Ein zuverläßiges Merkmal für die Resistenz der Phagocyten gegenüber Wasserzusatz gewährt die Phagocytose. Für die Feststellung der Minimumresistenz ermittelt man, mit wieviel Prozent Wasser man das Serum höchstens verdünnen kann, ohne daß sogar ein Teil der Phagocyten das Leben einbüßt. Der vollständige Behalt der Lebenstätigkeit wird dadurch konstatiert, daß nach Zurückführung der mit verdünntem Serum behandelten Leukocyten in normales Serum, die Phagocytose völlig wiederhergestellt ist.

Unsere Versuche haben gelehrt, daß Leukocyten, welche mit Serum behandelt worden sind, das mit 70% Wasser verdünnt war, nach Zurückführung in normales Serum ihr phagocytäres Vermögen ein wenig eingebüßt haben. Leukocyten die in mit 50% Wasser verdünntem Serum gelegen hatten, zeigten eine

solche Abnahme nicht. Nun wissen wir, daß auch rote Blutkörperchen des Pferdes ein mit etwa 60% Wasser verdünntes Serum ertragen, ohne daß sogar die am wenigsten resistenten Farbstoffverlust zeigen. Also stimmt die Minimumresistenz der Phagocyten mit dem der Erythrocyten gegenüber verdünntem Blutserum überein. Mit Hinsicht auf die allerdings geringere Schärfe des Phagocytoseverfahrens wäre es vielleicht vorsichtiger, das Resultat in der Weise auszudrücken, daß man keinen Unterschied zwischen der Minimumresistenz von Phagocyten und Erythrocyten konstatieren kann und wenn eine solche besteht, dieselbe geringfügig ist.

Und jetzt die Maximumresistenz! Um diesen bei den roten Blutkörperchen des Pferdes zu ermitteln, haben wir Serum mit größeren Quantitäten Wasser verdünnt, die Gemische mit einigen Tropfen des defibrinierten Blutes versetzt und nach einiger Zeit untersucht, bei welcher Verdünnung die Flüssigkeit vollkommen klar wurde, m. a. W. bei welcher Verdünnung alle Erythrocyten ihren Farbstoff verloren; das war zweifelsohne der Fall in der Flüssigkeit, wo das Serum mit 140% Wasser verdünnt war. Später bildet sich zwar eine Trübung: diese rührt aber von Paraglobulin her. Bekanntlich verringert sich die Löslichkeit dieser Substanz, je nachdem die Salzlösung mehr verdünnt wird. Daher daß im Serum, das mit 200% Wasser verdünnt war, der betreffende Niederschlag ausgiebiger war.

Gibt es nun Phagocyten, welche im Gegensatz zur Erythrocyten ein mit 140% Wasser verdünntes Serum wohl ertragen? Gewiß! Denn wenn man die mit solchem hochgradig verdünnten Serum in Berührung gewesenen Leukocyten in normales Serum zurückbringt, so zeigt es sich, daß noch eine große Anzahl der Phagocyten Kohle aufzunehmen imstande ist.

Eine ähnliche Erscheinung, obgleich im weniger ausgesprochenen Maße, beobachtet man, wenn das Serum mit 200% Wasser verdünnt worden ist. Auch dann haben noch eine bedeutende Anzahl Phagocyten ihre Lebenstätigkeit behalten. Wir haben konstatieren können, daß man das Serum sogar mit etwa 300% Wasser verdünnen kann, bevor alle Phagocyten ihre Aufnahmefähigkeit auf immer eingebüßt haben. Demnach ist die Maximum-Resistenz gegenüber Wasserzusatz und deshalb auch die Resistenzbreite bei den Phagocyten des

Pferdes viel größer als bei den Erythrocyten dieses Tieres.

Zusammenfassung.

I. Der Einfluß verschiedener Media auf das phagocytäre Vermögen der weißen Blutkörperchen läßt sich in ganz zuverlässiger Weise quantitativ bestimmen und also auch vergleichen durch Zählung der prozentischen Zellenmenge, welche Kohlepartikelchen aufgenommen haben.

II. Der Zusatz von Wasser zum natürlichen Medium, d. h. zum eigenen Blutserum der Phagocyten, macht sich in sehr nachteiliger Weise auf das phagocytäre Vermögen geltend. **Bereits ein Wasserzusatz, welcher einer wenig bedeutenden Herabsetzung des osmotischen Druckes der Blutflüssigkeit entspricht, erzeugt eine deutliche Abnahme der Phagocytose.**

So fanden wir in einer der Versuchsreihen, daß, während im normalen unverdünnten Serum 37 % der Leukocyten Kohle aufgenommen hatten, die betreffende Menge in mit 20 % Wasser verdünntem Serum 32 % betrug. Es entspricht das eine Abnahme der Phagocytose von $\frac{37-32}{37} \times 100 = \mathbf{13{,}5}\,\%$. Durch Zusatz von **50 %** Wasser zu dem Serum sank der Prozentgehalt der kohlehaltigen Leukocyten auf 21 %, also einer Abnahme von $\frac{37-21}{37} \times 100 = \mathbf{43}\,\%$. Durch Zusatz von **140** % und **200** % Wasser sank der Prozentgehalt der kohlehaltigen Leukocyten auf **0**, mit anderen Worten das phagocytäre Vermögen war aufgehoben; aber nur vorübergehend, denn:

III. Durch Zurückführung der durch Wasserzusatz in nachteiliger Weise beeinflußten Zellen in ihr eigenes unverdünntes Serum, kehrt das phagocytäre Vermögen wieder ganz oder teilweise zurück.

Vollständig war die Rückkehr, wenn das Serum mit 20 oder 50 % Wasser verdünnt worden war, teilweise wenn 70 oder 100 % Wasser hinzugesetzt gewesen waren. Ja selbst wenn die Verdünnung 200 % betragen hatte, eine Verdünnung, bei der, wie sub II erwähnt, die Phagocytose ganz aufgehoben war, konnte noch eine

Wiederherstellung des phagocytären Vermögens zu mehr als der Hälfte des ursprünglichen wahrgenommen werden.

Erst Verdünnung des Serums mit 300 % Wasser machte dem phagocytären Vermögen auch der meist resistenten Phagocyter für stets ein Ende.

IV. Die hier bei den Phagocyten beobachteten Erscheinungen stimmen mit den früher bei roten Blutkörperchen wahrgenommenen überein:

1. können die Phagocyten eine große Wassermenge ertragen, ohne zugrunde zu gehen (vergl. sub III). Das gleiche zeigte sich auch früher bei den roten Blutkörperchen (vergl. sub 6c);
2. können die durch Wasserzusatz in den Phagocyten erzeugten Veränderungen, insoweit letztere nicht zu einer Zerstörung geführt haben, durch Zurückführung in unverdünntes Serum wieder rückgängig gemacht werden. Ähnliches wurde früher auch bei den roten Blutkörperchen gefunden;
3. ebenso wie die am wenigsten resistenten Erythrocyten können auch die am wenigsten resistenten Phagocyten ein Serum vertragen, das mit etwa 60 % Wasser verdünnt worden ist, ohne zerstört zu werden.

Die sogen. Minimumresistenz gegenüber Wasserzusatz ist also die gleiche.

Dagegen ist die Serumverdünnung, welche von den am meisten resistenten Phagocyten ertragen wird, weit bedeutender als die, welche die am meisten resistenten roten Blutkörperchen ertragen.

Bei den Phagocyten ist also die Maximum-Resistenz gegenüber Wasserzugabe größer als bei den Erythrocyten — und weil die Minimum-Resistenz die gleiche ist — auch die Resistenzbreite größer.

Beitrag zur Frage nach der kolloidalen Natur von Albumosenlösungen.[1])

Von

Peter Rona und **Leonor Michaelis.**

(Aus dem chemischen und aus dem bakteriologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1906.)

Bei der vor kurzem von uns angegebenen Methode der Enteiweißung mit Mastix wurden die Eiweißkörper infolge ihres Verhaltens als kolloidal gelöste Körper entfernt, also infolge einer physikalischen Zustandseigenschaft. Andere, sich in einem ähnlichen Lösungszustand wie Eiweiß befindende Körper können also bei der Methode ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen werden. Von diesen anderen Körpern spielen aber sowohl in quantitativer Hinsicht wie mit Rücksicht auf die in Frage kommenden Probleme die höheren, noch kolloidalen Abbauprodukte des Eiweißes die bedeutendste Rolle. Es war daher unsere nächste Aufgabe, das Verhalten dieser bei der Mastixfällung zu studieren. Dies war um so mehr geboten, weil bei der Frage des Reststickstoffes, die das Ziel aller dieser Untersuchungen ist, gerade diese Körper bestimmt werden sollen. Die erste Frage, die zu beantworten war: Werden Albumosen usw. bei der Mastixfällung mitgefällt oder bleiben sie im Filtrat? Oder: werden sie teilweise gefällt, und dann, welcher Teil wird gefällt, welcher wird von der Mastixfällung nicht berührt und bleibt in Lösung?

---

[1]) Fortsetzung unserer früheren Mitteilung: Michaelis und Rona, Über eine Methode zur Entfernung von Kolloiden aus ihren Lösungen. Diese Ztschr. **2**, 219. 1906.

Diese Frage konnte nur durch Zusatz bekannter, vorher studierter Albumosengemische zu Blutserum gelöst werden.

Wir benutzten als Testobjekt ein höheres Albumosengemisch, das „Peptonum siccum Riedel"; es ist durch peptische Verdauung aus Rinderfibrin hergestellt, enthält 14,8 % N. Der mit $ZnSO_4$ bei leicht essigsaurer Lösung aussalzbare Anteil davon beträgt 49,3 %, der nicht aussalzbare, noch stark Biuretreaktion gebende Anteil beträgt 50,7 %. Daraus ist ersichtlich, daß unser Präparat etwas über die Hälfte aus „niederen", zur kleineren Hälfte aus „höheren" Albumosen bezw. Peptonen besteht.

Die wässrige Lösung des Pepton „Riedel" enthielt kein durch Hitze koagulables Eiweiß, bei der Ferrocyankaliumprobe und der (übrigens für Eiweiß und höhere Albumosen sehr empfehlenswerten) Sulfosalicylsäureprobe entsteht eine Trübung, die sich bei Ferrocyankalium teilweise, bei Sulfosalicylsäure völlig bei mäßigem Erwärmen löst und in der Kälte wieder ausscheidet. HNO_3 erzeugt einen Niederschlag, der sich beim Erwärmen unter Gelbfärbung ebenfalls leicht löst und beim Erkalten wieder ausscheidet. Mit Alkohol entsteht eine reichliche Fällung, die aber auch nach tagelangem Stehen unter Alkohol ihre Wasserlöslichkeit nicht verliert. Die Lösung des „Peptons" reagiert neutral, enthält weder Chloride noch Sulfate.

Wenn man eine beliebige Lösung dieses Peptongemisches mit irgend einer Mastixemulsion versetzt, so entsteht bei jedem Mischungsverhältnis eine Ausflockung, ohne daß man einen Elektrolyten zufügt. In dieser Hinsicht unterscheidet sich Pepton vom Eiweiß, wo ja ein Überschuß des Eiweiß oder des Mastix die direkte Fällung ohne Elektrolyten verhindert.

Fügt man daher zu einem Serum-Albumosengemisch eine alkoholische Mastixlösung in der früher von uns beschriebenen Weise hinzu, in der Erwartung, daß der Mastix zunächst als eine homogene, milchige Suspension erscheinen werde, so sieht man sich darin getäuscht, weil der Mastix gleich grobflockig ausfällt.

Wenn man jedoch die Peptonlösung durch Soda ganz schwach alkalisch macht, so entsteht die Flockung beim Mastixzusatz ohne Elektrolyt nicht, sondern erst beim nachträglichen Ansäuern.

Um die Eiweiß- und Pepton-Teilchen mit einer möglichst großen Mastixoberfläche in Berührung zu bringen, ist es daher zunächst vorteilhaft, die Mastixemulsion nicht erst in der Eiweiß-

lösung entstehen zu lassen, sondern im fertigen Zustande zuzufügen.

Wohl in einem inneren Zusammenhang mit dem soeben erwähnten Unterschied von Eiweiß und Albumosen steht die Tatsache, daß der bei der Enteiweißung erforderliche sehr große Überschuß von Mastix bei der Ausfällung von Albumosen nicht nötig ist. Daher ist eine gegebene Menge Mastixemulsion imstande, eine viel größere Menge von Albumosen zu fällen als von Eiweiß, was für die weitere Versuchsanordnnng sehr günstig ist.

Wir verfahren folgendermaßen:

Wir versetzen 50 ccm Blutserum, in dem wir 2 g Pepton-Riedel aufgelöst haben, mit 150 ccm absolutem Alkohol, lassen mehrere Stunden bis zu einem Tage stehen, verjagen dann den größeren Teil des Alkohols auf dem Wasserbade bei gelinder Wärme, und digerieren dann das Gemisch längere Zeit sorgfältig mit 200 ccm lauwarmem Wasser (um die durch den Alkohol gefällten Albumosen wieder in Lösung zu bringen); dann fügen wir unter starkem Rühren auf einmal eine Mastixemulsion hinzu, die aus 200 ccm 10%igen absolut alkoholischem Mastix und 500 Wasser bereitet worden ist.

Die milchige, zunächst anscheinend homogene Flüssigkeit zeigt in unserem Fall nach einigen Sekunden eine Flockung, die nunmehr durch Hinzufügen von 10 ccm 10%ige Lösung von $MgSO_4$ vollkommen gemacht wird. Bald setzt sich der Niederschlag ab, und die eiweißfreie Flüssigkeit kann leicht klar filtriert werden.

Die immer zu erstrebende gleichmäßige Umhüllung der Eiweiß-Peptonlösung durch die Mastixteilchen vor der Ausflockung kann man noch dadurch einfacher erreichen, daß man das Gemisch unmittelbar vor dem Mastixzusatz durch Soda ganz schwach alkalisch macht, wodurch zunächst auch bei Gegenwart von Albumosen die Fällung unterdrückt wird, und dann erst, nach dem Mastixzusatz, mit Essigsäure schwach ansäuert und Elektrolyt zugibt.

(Durch diese kleine Modifikation ist das Verfahren auch im Fall von hohem Peptongehalt anwendbar; außerdem ist erheblich weniger Mastix angewendet worden als bei unserem ursprünglichen Verfahren, wodurch die weitere Verarbeitung des Niederschlags bequemer wird. Wir wenden daher die Methode in dieser Form auch bei Enteiweißung im allgemeinen an.)

Die starke Biuretreaktion des Filtrats zeigt sofort an, daß zum mindesten ein Teil der Albumosen nicht ausgefällt worden ist. Das Filtrat gab keine Kochprobe, keine Trübung mit Sulfosalicylsäure, keine Ringprobe mit HNO_3; hingegen eine schwache, beim Erwärmen teilweise heller werdende Trübung mit Essigsäure-Ferrocyankalium; beim Sättigen mit Ammonsulfat entstand eine Trübung, mit Phosphorwolframsäure ein dicker Niederschlag. Der Stickstoffgehalt des Gesamtfiltrats betrug in sechs ganz analogen Fällen, in denen wir zu 50 ccm Rinderserum je 2 g Pepton (= 0,296 g N) zugefügt hatten,

Fall I: 0,200, II: 0,215, III: 0,217,
IV: 0,202, V: 0,214, VI: 0,216 g N,
im Mittel also 0,211 g N, d. h. 71,3 % des gesamten Pepton-N.

Die übereinstimmenden Zahlen zeigen zunächst, daß unter gleichen Arbeitsbedingungen ein ganz bestimmter Anteil des „Peptons" von der Mastixfällung nicht mitgerissen wird, während ein bestimmter Anteil sich als Kolloid verhält und aus dem Niederschlag wiedergewonnen werden muß.

Zur Wiedergewinnung des noch fehlenden Albumosenanteiles aus dem Niederschlag haben wir nun zunächst versucht, diesen, doch in Wasser löslichen Teil aus dem in Wasser unlöslichen Mastix-Eiweißniederschlag durch Kochen mit Wasser zu extrahieren. Dies gelang jedoch nicht. Trotz langem Kochen mit Wasser erhielten wir ein Filtrat, welches keine Spur von Biuretreaktion gab (Fall I und II). Die Anwesenheit der großen Menge Mastix verhindert die Einwirkung des Wassers. Wir entfernten daher den Mastix, indem wir den auf der Nutsche gut abgepreßten Niederschlag auf einem Tonteller trockneten und dann im Soxhlet gründlich durch Chloroform vom Mastix befreiten, bis das Chloroform keinen Rückstand mehr hinterließ. Das zurückgebliebene Eiweiß-Peptongemisch wird nun sehr energisch wiederholt bis zum Verschwinden der Biuretreaktion mit Wasser ausgekocht, vom Eiweiß abfiltriert und die Filtrate vereinigt. Das Filtrat zeigt nunmehr starke, rein rote Biuretreaktion, keine Kochprobe, dagegen die meisten der vorher genannten Albumosenreaktionen. Der Stickstoffgehalt des Filtrats betrug in vier analogen Fällen

Fall III: 0,062, IV: 0,056, V: 0,066, VI: 0,063,
also im Mittel 0,062 g N.

Der gesamte von den zugesetzten 0,296 g wiedergefundene Peptonstickstoff betrug also in

Fall III: 0,279, IV: 0,258, V: 0,280, VI: 0,279 g,
im Mittel also 0,274 g.

Davon gehen ab der Reststickstoff unseres Blutserums gleich 0,019 g N; wir haben also in Wirklichkeit von den 0,296 g zugesetzten N 0,255 wiedergefunden. Eine noch sorgfältigere Auskochung des sehr gründlich entmastixten Niederschlags wird den Verlust zweifellos noch weiter herabdrücken. Erst im Laufe der Untersuchungen lernten wir die Notwendigkeit erkennen, auch die allerletzten Reste des Mastix aus dem Niederschlag zu entfernen; minimale Rückstände des Mastix erschweren die Extraktion mit Wasser ungemein. Eine technische Schwierigkeit involviert übrigens diese Anforderung gar nicht.

Wir haben also mit der Mastixfällung unser Abumosengemisch in zwei Fraktionen geteilt, eine gefällte und eine ungefällte. Nun fragt es sich, ob diese Teilung beliebige, wechselnde Anteile des ursprünglichen Peptongemisches betrifft, oder ob die beiden Teile wohl charakterisiert sind. Für das letztere sprechen schon die konstanten N-Zahlen für die einzelnen Fraktionen. Noch beweisender ist folgende Versuchsanordnung.

Wurde zu dem eiweißfreien, peptonhaltigen Filtrat, welches die durch Mastix nicht gefällten Peptone enthielt, nach starker Einengung nochmals Blutserum zugefügt, und wiederum mit Mastix entweißt, so fand sich im Filtrat das gesamte zugesetzte Pepton wieder.

Gefunden im eiweißfreien, peptonhaltigen Filtrat 0,063 g N; wiedergefunden im eiweißfreien, peptonhaltigen Serum nach Zusatz obigen Filtrats abzüglich des entsprechenden Reststickstoffes 0,064 g N.

Daraus ist ersichtlich, daß die einmal mit Mastix nicht ausgefallene Peptonmenge durch Mastix überhaupt nicht fällbar ist.

Um zu sehen, ob etwa bei wechselnder Konzentration der Peptonlösung durch Mastix wechselnde prozentualische Anteile gefällt werden, machten wir folgenden Versuch.

10 ccm vierprozentiger Peptonlösung wurden einmal (a) mit 200 ccm Mastixemulsion, ein zweites mal (b) mit 500 ccm einer gleichen Mastixemulsion gefällt. Im Filtrat fand sich in beiden Fällen die gleiche N-Menge.

Im Filtrat von a fand sich 0,045 g N;
Im Filtrat von b fand sich 0,045 g N.

Wie sich aus diesen Zahlen ergibt, fanden wir, in guter Übereinstimmung mit dem obigen, unter diesen ganz anderen Bedingungen wiederum dreiviertel des Gesamt-N unseres Peptons als durch Mastix nicht fällbar wieder.

Fernerhin wurden die gesammelten, durch Auslaugung des entmastixten Niederschlags gewonnenen Filtrate daraufhin untersucht, ob sie wirklich nur „höhere" Albumosen enthielten.

Dieses Filtrat wurde mit Ammonsulfat gesättigt, von dem entstandenen Albumosenniederschlag abfiltriert, und mit dem Filtrat die Biuretreaktion angestellt, nachdem durch Erwärmen mit einer ausreichenden Menge von NaOH auf dem Wasserbad das Ammoniak vertrieben war, welches die Biuretreaktion erheblich stört. Die Biuretreaktion war negativ, während eine in gleicher Weise behandelte wäßrige Lösung von Pepton-Riedel natürlich noch starke Biuretreaktion gab. Es sind also durch den Mastix nur höhere, aussalzbare Albumosen gefällt worden.

Im Anschluß daran drängt sich nunmehr die Frage auf, ob die Aussalzbarkeit der Albumosen parallel geht mit der Fällbarkeit durch Mastix. Das ist nun nicht der Fall, denn das Filtrat der Mastixfällung gibt bei Sättigung mit Ammonsulfat nochmals eine Trübung. Es sind also zwar alle durch Mastix fällbaren Albumosen aussalzbar, aber nicht alle aussalzbaren Albumosen durch Mastix fällbar.

Da unsere Versuche zeigten, daß ein konstanter Anteil der Albumosen mit Mastix fällt, so ist es nicht unberechtigt, den Grund dafür in der kolloidalen Beschaffenheit dieses Anteils zu suchen, und offenbar sind dies die Albumosen höherer Zusammensetzung, wie auch aus ihrer Aussalzbarkeit hervorgeht. Andererseits zeigt sich aber, daß die Aussalzbarkeit sich keinesfalls mit der auf diese Weise definierten kolloidalen Beschaffenheit deckt, und daß bei der Aussalzung noch andere Faktoren als Ionenwirkung, wie das auch ursprünglich Hofmeister angenommen hat, in Betracht kommen.

Jedenfalls folgt praktisch aus diesen Resultaten, daß wir ein neues Trennungsprinzip „höherer" und „niederer" Albumosen gewonnen haben, welches bei der Analyse des Reststickstoffs verwendbar ist.

Das eiweißfreie Filtrat kann auf Aminosäuren, Diaminosäuren, Polypeptide weiter verarbeitet werden. Bei der orientie-

renden Vorprüfung auf Körper, die mit Phosphorwolframsäure fallen, bedarf es nur der Beobachtung folgender Vorsichtsmaßregel:

Es entsteht aus dem Mastix im Verlauf der Manipulationen, meist nur in Spuren, manchmal in größerer Menge, ein N-freier wasserlöslicher Körper dessen Natur wir nicht näher untersuchten, der mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag gibt. Kontrollversuche ergaben, daß die Entstehung dieses „Mastixkörpers" nichts mit dem Eiweißzusatze zu tun hatte. Derselbe Körper gibt auch mit Tannin eine Fällung, welche im Überschuß von Tannin wieder löslich ist. In einer mit einem Überschuß von Tannin versetzten Lösung fällt dieser „Mastixkörper" nachträglich durch Schwefelsäure-Phosphorwolframsäure nicht wieder aus.

Albumosen verhalten sich gegen Tannin bekanntlich derart, daß die einen mit ihm irreversible, die anderen im Überschuß von Tannin lösliche Fällungen geben. Die Phosphorwolframsäurefällung der Eiweißabbauprodukte wird dann durch die Anwesenheit eines Tanninüberschusses nicht gestört. Um also die Flüssigkeit qualitativ auf durch Phosphorwolframräure fällbare Abbauprodukte prüfen zu können, verfährt man so, daß man sie mit sehr reichlich Tannin versetzt, von einem etwa bleibenden Niederschlag abfiltriert, und dann dem Filtrat in gewöhnlicher Weise H_2SO_4 und Phosphorwolframsäure zusetzt. Ein Niederschlag zeigt dann eindeutig durch Phosphorwolframsäure fällbare Abbauprodukte an.

Zwei neue Bildungsweisen des Isoserins[1]).

Von

C. Neuberg und P. Mayer.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1906.)

Vor einigen Jahren haben C. Neuberg und H. Wolff[2]) ein Verfahren zur Darstellung von Oxyaminosäuren angegeben, das in der Anwendung der Cyanhydrinreaktion auf Aminoaldehyde beruht; so konnten aus dem natürlich vorkommenden Aminoaldehyd Glukosamin die beiden stereoisomeren (α- u. β-) 2-Amino-d-glukoheptonsäuren:

$$\begin{array}{l} \quad\quad\quad\;\; H \;\;\; H \;\;\; OH \\ CH_2OH-C-C-C-CH\cdot NH_2-CHO \\ \quad\quad\quad\;\; OH \; OH \; H \end{array}$$

$$+\ CHN \begin{cases} \begin{array}{l} \quad\quad\quad\quad\;\; H \;\;\; H \;\;\; OH \quad\quad\quad\quad\quad\; OH \\ CH_2\cdot OH-C-C-C-CH(NH_2)-C-COOH \\ \quad\quad\quad\quad\;\; OH \; OH \; H \quad\quad\quad\quad\quad\;\; H \end{array} \\ \begin{array}{l} \quad\quad\quad\;\; H \;\;\; H \;\;\; OH \quad\quad\quad\quad\; H \\ CH_2OH-C-C-C-CH\cdot NH_2-C-COOH \\ \quad\quad\quad\;\; OH \; OH \; H \quad\quad\quad\quad\;\; OH \end{array} \end{cases}$$

erhalten werden. Dasselbe Verfahren läßt sich auch auf den einfachsten Vertreter der Aminoaldehyde, den Aminoacetaldehyd, anwenden und liefert, wie vorauszusehen, Isoserin:

$$CH_2\cdot NH_2-CHO + HCN \longrightarrow CH_2\cdot NH_2-CH\cdot OH-COOH$$

---

[1]) Zum Teil in der Dissertation von M. Silbermann, Berlin 1905 (bei G. Schade) veröffentlicht.

[2]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **35**, 4018. 1902 u. **36**, 618. 1903.

Dabei können, wie Neuberg und Wolff schon (a. a. O.) angegeben haben, an Stelle der meist schwer zugänglichen Aminoaldehyde ihre Salze benützt werden, indem man z. B. das Chlorhydrat oder Sulfat mit Cyanammonium oder Cyankalium zusammenbringt.

Zum Isoserin führte auch ein Versuch, der angestellt wurde, um eine neue Methode zur Darstellung des Serins zu finden. Als Ausgangsmaterial diente die α-β-Dibrompropionsäure. Nach Versuchen von H. Beckurts und R. Otto[1]) wird nämlich diese Säure durch Silberoxyd in α-Brom-β-oxypropionsäure verwandelt. Die Autoren heben ausdrücklich die leichte Beweglichkeit des Halogenatoms in dieser Säure hervor, sodaß es a priori nicht ausgeschlossen war, daß durch Umsetzung mit NH_3 die α-Amino-β-oxypropionsäure (Serin) entstehen konnte. Allein der Versuch ergab, daß **α-Oxy-β-aminopropionsäure** (Isoserin) das Produkt der Einwirkung von Ammoniak darstellt. Offenbar wird hier durch Bromwasserstoffentziehung intermediär Epihydrinsäure gebildet resp. die Imidosäure, die dann durch Ammoniak- bezw. Wasseraddition Isoserin ergibt.

$$\begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ CHBr \\ | \\ COOH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} CH_2 \\ | \\ CH \\ | \\ COOH \end{array}\!\!>\!O \quad \text{oder} \quad \begin{array}{c} CH_2 \\ | \\ CH \\ | \\ COOH \end{array}\!\!>\!NH \longrightarrow \begin{array}{c} CH_2NH_2 \\ | \\ CHOH \\ | \\ COOH. \end{array}$$

Demnach entsteht Isoserin bei einer ganzen Reihe von Umsetzungen in der Drei-Kohlenstoffreihe [vergl. C. Neuberg und M. Silbermann[2]) sowie C. Neuberg und E. Ascher[3])].

I. Aus 10 g Amidoacetal wurde nach der Vorschrift von E. Fischer[4]) eine frische Lösung von salzsaurem Aminoacetaldehyd dargestellt; dieselbe wurde, — ohne daß die von der Darstellung anhaftende Salzsäure völlig in vacuo entfernt gewesen wäre — mit verdünntem Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion und gleichzeitig mit der doppelten Quantität der theoretisch erforderlichen Menge 50 %iger Blausäure versetzt. Nach 8 tägigem Stehen war das Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung ver-

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **18**, 236. 1884.

[2]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **37**, 341. 1904.

[3]) Biochem. Ztschr. **1**, 380. 1906.

[4]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **26**, 93. 1893.

schwunden. Nunmehr wurde die Flüssigkeit bis zum Aufhören des Ammoniak- und Blausäuregeruches gekocht, auf ca. 50 ccm eingeengt und nach Zusatz von 50 ccm rauchender Salzsäure noch $^1/_2$ Stunde erwärmt. Dann wurde die Lösung im Vakuum zum dicken Sirup konzentriert, dieser wieder in Wasser gelöst, mit Bleikarbonat bis zur Bindung fast allen Halogens und bis zur Austreibung des Ammoniaks erwärmt. Hierbei wird die vorher dunkle Flüssigkeit derart entfärbt, daß das Filtrat der Bleisalze wasserklar ist; nach Entfernung von gelöstem Blei durch Schwefelwasserstoff und Filtration vom Bleisulfid wird eingeengt, dabei vom gelösten H_2S befreit und mit Kupferkarbonat, dem ein wenig Kupferoxydul beigefügt war, gekocht. Die blaugefärbte Flüssigkeit wurde von den unlöslichen Kupfersalzen abfiltriert und auf ein kleines Volumen eingeengt. Da der zurückbleibende Sirup auch bei längerem Stehen nicht kristallisierte, wurde er mit Wasser verdünnt und vorsichtig in absoluten Alkohol eingetropft. Das flockig abgeschiedene Kupfersalz wurde abgesaugt; nunmehr kristallisierte es aus Wasser und hatte die Eigenschaften und Zusammensetzung der Isoserinverbindung.

0,1802 g Substanz ergaben 0,0651 g CuO (= 0,0520 g Cu)

0,1755 g Substanz verbrauchten (nach Kjeldahl) 8,2 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 (= 0,0115 g N).

Berechnet für $C_3H_5O_3NCu + 3\ H_2O$	Gefunden
Cu = 28,63%	Cu = 28,84%
N = 6,36%	N = 6,53%.

II. Das Ausgangsmaterial für die beabsichtigte Darstellung von Serin bildete reine, kristallisierte α-β-Dibrompropionsäure, welche in wässeriger Lösung mit Silberkarbonat, wie bereits in der Literatur beschrieben,[1]) folgendermaßen reagiert:

$$\begin{array}{l} CH_2Br \\ | \\ CHBr \\ | \\ COOH \end{array} + AgOH = \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHBr \\ | \\ COOH \end{array} + AgBr$$

Das entstehende Produkt, die α-Bromglycerinsäure, wurde nicht in Substanz isoliert, sondern direkt mit Ammoniak behandelt.

[1]) H. Berckurts u. R. Otto, a. a. O.

Im einzelnen gestaltete sich der Versuch folgendermaßen:

11 g Dibrompropionsäure wurden in Wasser gelöst und mit der berechneten Menge (6,7 g) Silberkarbonat eine halbe Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Hierauf wurde von dem ausgeschiedenen Bromsilber abfiltriert und nach Zugabe von festem Ammoniumkarbonat bis fast zur Trockene gedampft. Der Rückstand wurde mit 70 ccm konz. Ammoniak und 30 g Ammoniumkarbonat im eisernen Autoklaven auf 100° erhitzt, wobei der Druck auf etwa 10 Atmosphären stieg. Es handelte sich nun darum, die entstandene Aminosäure vom Ammoniumbromid zu trennen. Zu diesem Zweck wurde der Autoklaveninhalt zunächst für sich, dann mit einer Lösung von 22 g Baryumhydroxyd unter Ersatz des verdampften Wassers mehrere Male im Vakuum eingedampft, bis der Geruch nach Ammoniak völlig verschwunden war. Darauf wurde das Baryum durch Ausfällen mit Schwefelsäure entfernt, das Filtrat mit Bleioxyd gekocht, vom Bleisulfat + Bleibromid usw. abfiltriert und das in Lösung gegangene Blei durch Einleitung von Schwefelwasserstoff entfernt. Die schließlich erhaltene, durch Eindampfen konzentrierte Lösung schied auf Zusatz von Alkohol weiße Kristalle ab, die nach einigem Stehen abgesaugt und aus heißem Wasser umkristallisiert wurden. Die Ausbeute betrug 1,2 g.

Zur Entscheidung der Frage, ob die erhaltene Verbindung Serin oder Isoserin sei, wurde ein Teil der Substanz in die Phenylcyanatverbindung übergeführt. 0,5 g wurden in Wasser gelöst und mit 5 ccm Normalnatronlauge und 0,75 g Phenylcyanat geschüttelt, bis der Geruch nach letzterem verschwunden war. Die vom ausgeschiedenen Diphenylharnstoff abfiltrierte Flüssigkeit schied beim Ansäuern mit 5 ccm Normalsalzsäure eine weiße Fällung ab, die abgesaugt wurde. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus 50%igem Alkohol zeigte sie den Schmelzpunkt von Isoserinnaphtylcyanat, 181°, während die entsprechende Serinverbindung nach E. Fischer u. Leuchs[1]) bei 168 bis 169° schmilzt.

0,1472 g Substanz ergaben 16,0 ccm N. (16_0 763 mm).

Für $C_{10}H_{12}O_4N_2$ Ber.: 12,50 N. Gef.: 12,69 N.

Ganz charakteristisch ist bekanntlich für das Isoserin sein Kupfersalz, dessen Zusammensetzung von der des Serinkupfers erheblich abweicht. Die Verwandlung in das Kupfersalz geschah

---

[1]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. 35, 3787. 1902.

durch Kochen der wässerigen Lösung mit Kupferkarbonat, Filtration vom ungelösten und Konzentration auf ein kleines Volumen usw. Auch die Analyse des Kupfersalzes zeigte, daß die Isoserinverbindung vorlag.

0,1505 g der Substanz ergaben 0,0369 g H_2O und 0,0540 g CuO (= 0,0432 Cu.)

Für $C_3H_5O_3NCu + 3\ H_2O$.

Berechnet:		Gefunden:
28,63 %	Cu	28,83 %
24,54 %	H_2O	24,52 %.

Die Ausbeute betrug bei dieser Darstellung 1,2 g Isoserin, im Falle I. 1,5 g kristallisiertes Kupfersalz; ob nebenher noch andere Produkte entstehen, ist nicht untersucht.

Zur praktischen Gewinnung von Isoserin eignen sich diese beiden Bildungsweisen also nicht. Von Wert wäre es, wenn es gelingt, auf die Aminoaldehyde wie die Cyanhydrinreaktion auch die Streckersche Reaktion anzuwenden, welche zu Diaminosäuren führen müßte.

Über die Stickstoffernährung der Hefe.

(Ein Beitrag zur Physiologie der Hefe.)

Von

Hans Pringsheim.

(Aus dem Landwirtschaftlich-Bakteriologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 3. Januar 1907.)

Die Untersuchungen über die Stickstoffernährung der Hefe müssen zwei Fragen beantworten; erstens welche stickstoffhaltigen Körper können überhaupt zur Ernährung der Hefe dienen, und zweitens welchen Einfluß hat die Stickstoffernährung der Hefe auf deren Lebenstätigkeit? Die Lebenstätigkeit der Hefe nun äußert sich in verschiedener Weise, in ihrem Vermehrungsgrad, ihrer Gärwirkung und dem Stickstoffumsatz während der Gärung. Weiterhin wird durch die Stickstoffernährung auch die Bildung von Nebenprodukten der Gärung beeinflußt. Es soll deshalb in dieser Arbeit der Versuch gemacht werden die gestellte Frage in drei Teilen zu beantworten. Teil I wird von für die Stickstoffernährung geeigneten, im besonderen für die zur Aufzucht einer gärfähigen Hefe verwendbaren, Substanzen handeln. Teil II wird die Einflüsse der Stickstoffernährung, auf die Gärwirkung, den Vermehrungsgrad und den Stickstoffumsatz und Teil III die Einflüsse auf die Bildung von Nebenprodukten betreffen.

Teil I.

Die Stickstoffquellen der Hefe und der Einfluß ihrer chemischen Konstitution auf die Gärfähigkeit.

Die Stickstoffnahrung, welche der Hefe an den Standorten der Natur z. B. auf den Traubenbeeren geboten wird, ebenso wie die, welche sie seit Jahrhunderten in den Betrieben der Alkoholindustrie gefunden hat, ist ein schwer entwirrbares Gemisch kompliziert zusammengesetzter organischer Körper. Aus unserer Kenntnis über die Ernährung der Pflanzen, speziell deren Ansprüche an die Stickstoffversorgung, ließ sich erwarten, daß auch die Hefe zu einer Entfaltung ihrer Lebenstätigkeit kommen kann, wenn ihr nur der in einem einheitlichen Körper enthaltene Stickstoff geboten wird. Der erste Versuch die Hefe auf diese Weise zu ernähren wurde mit Erfolg von Pasteur gemacht, der in seiner Aufsehen erregenden Untersuchung feststellte, daß die Hefe in der mineralischen Zuckernährsalzlösung zu Entwicklung und Zuckervergärung kommt, wenn ihr Ammoniumsalze als Stickstoffquelle zur Verfügung stehen. Seit dieser Zeit wurde nur noch das Asparagin als einheitliche Substanz, die sich zur Hefeernährung eignet, erkannt und in zahlreichen Untersuchungen über diesen Stoffwechsel verwandt. Daß gerade das Asparagin zu diesem Zwecke herangezogen wurde, war aber ein mehr zufälliges Ergebnis, begründet durch die leichte Isolierbarkeit dieser Substanz aus keimenden Samen.

Wollte man auf diesem Gebiet weiter forschen und weitere stickstoffhaltige Substanzen auf ihre Eignung als Stickstoffquellen für die Hefe prüfen, so konnte man naturgemäß nicht den Zufall walten lassen, sondern man mußte sich an die Resultate der organischen Chemie anlehnen und als Wegweiser die chemische Konstitution der zu untersuchenden Körper nehmen. Emil Fischer[1]) hat dasselbe ja mit so großem Erfolg für die Zuckerarten getan, die die Hefe vergären kann. Da die Hefe nun aber zwei Lebensfunktionen äußert, ihr vegetatives Leben und die ihr durch die

[1]) Vergleiche hierüber: E. Abderhalden, Lehrbuch der physiologischen Chemie (1906) 503, wo sich auch die Literaturangaben finden.

Wirkung ihrer Enzyme möglich gemachte Zuckergärung, so muß man die Frage nach der Eignung einer Nahrungsquelle auch getrennt behandeln und ermitteln, ob eine Zuckerart zum Zellaufbau oder zur Vergärung dienstbar gemacht werden kann. Während nun die Verwendbarkeit verschiedener Zuckerarten als Gärquellen schon systematisch erforscht ist, beschränkt sich unsere Kenntnis auf die zum Zellaufbau nützlichen Kohlenhydrate noch sehr![1]) Diese getrennte Beantwortung der gestellten Frage läßt sich nun aber auch auf die Stickstoffnahrung übertragen. Die Frage lautet hier also, welche Stickstoffquellen können nur zum Aufbau der vegetativen und welche zur Heranzucht einer Hefe dienen, die ihr gebotenen Zucker auch als Energiematerial durch die Gärung ausnutzen kann? Bei der Beurteilung der für diese beiden Zwecke dienstbaren Stickstoffquellen mußte nun unsere Kenntnis der Eiweißchemie in das Bereich der Betrachtung gezogen werden. Denn die Lebensäußerungen der Hefe sind die Folge ihrer Protoplasmafunktionen, der Einfluß der gebotenen Stickstoffquelle muß sich daher als die Folge der Fähigkeiten ihrer protoplasmatischen Eiweißsubstanzen äußern. Während sich bis jetzt aber kein Einfluß der Konstitution der Stickstoffquelle auf die Funktionen des fertig gebildeten Eiweiß hat verfolgen lassen[2]), weil die Zelle in den bekannten Fällen durchgreifende Änderungen mit der gebotenen Stickstoffquelle vornimmt, ehe sie den Stickstoff ihrem Protoplasma einverleibt, und weil auch wohl unsere Kenntnis in der Eiweißchemie zu gering war, so ließ sich in dem uns vorliegenden Falle bei der Hefe doch ein überraschender Zusammenhang zwischen der Konstitution der Stickstoffnahrung und den Lebensfunktionen der auf ihr herangezogenen Hefezelle finden.

Um diesen Zusammenhang verständlich zu machen, müssen ein paar erklärende Worte über die Ergebnisse der neuesten Forschung auf dem Gebiete der Eiweißchemie vorangeschickt werden. Schon die frühere Eiweißchemie kannte zahlreiche Spaltungsprodukte des Eiweiß, schon ihr war bekannt, daß die Aminosäuren unter ihnen eine große Rolle spielen. Aber erst durch die Unter-

---

[1]) Vergleiche hierzu die zusammenfassenden Resultate bei Lafar, Handbuch der technischen Mykologie **4**, 94.

[2]) Vergleiche hierzu z. B. L. Jost, Vorlesungen über Pflanzenphysiologie **1904**, 173.

suchungen Emil Fischers[1]) wurde erkannt, daß der in allen α-Aminosäuren vorhandenen Gruppe -NH·CH·CO- eine besondere Bedeutung zukommt, da nach seinen Anschauungen die Aminosäuren im Eiweiß mit Hilfe solcher Gruppen in amidartiger Verkettung sich vorfinden. Der Erkenntnis dieses Zusammenhanges verdanken wir dann auch die ersten Versuche zur Eiweißsynthese, die Fischer dadurch unternahm, daß er durch Verkuppelung von Körpern, die der Aminosäureklasse angehören, und die alle die Gruppe -NH·CH·CO- enthalten, zu der von ihm Peptide genannten Körperklasse gelangte, die also die amidartigen Anhydride der Aminosäuren sind und in naher Beziehung zu den Peptonen und Albumosen stehen. So wurde ein neuer Zusammenhang zwischen Eiweißabbau und -aufbau geschaffen und der Gedanke nahegelegt, daß auch in der Zelle der Weg von der einfach konstituierten Stickstoffquelle zum Eiweiß über die Aminosäuren und deren Verkuppelungskomplexen, den Peptiden führt.

Zieht man diese Betrachtung zum Vergleich heran und summiert man die Resultate, welche ich über die Verwendbarkeit verschieden konstituierter Stickstoffquellen auf die Lebenstätigkeit der Hefe gewonnen habe, dann kommt man zu folgender kurzen Zusammenfassung: Die Hefe ist imstande, ihre Leibessubstanz mit Hilfe recht verschieden konstituierter stickstoffhaltiger Substanzen aufzubauen. Zu einer Vergärung des ihr gebotenen Zuckers kommt die Hefe jedoch nur dann, wenn ihr eine Stickstoffquelle geboten wird, die die Gruppe -NH·CH·CO- enthält.

Auffallend ist, daß nicht nur die in gerader Kette enthaltene -NH·CH·CO-Gruppe, sondern auch die im Ring vorkommende zum Aufbau gärfähiger Hefe geeignet ist. Dies zeigte sich dadurch, daß auch Harnstoffderivate die Heranzucht solcher Hefe gestatteten. Jedenfalls durfte man unter diesen Umständen nicht von den α-Aminosäuren oder deren Derivaten als einzigen für die Bildung gärkräftigen Plasmas geeigneten Stickstoffquellen sprechen, sondern man mußte sich an die genannte Gruppe halten, die allen α-Aminosäurederivaten und einigen ringförmigen Körpern zukommt. Gerade für die letzteren bedarf die Eignung der genannten im

[1]) Zusammenfassende Resultate. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 530. 1906.

Ringenthaltenen Gruppe noch einer etwas ausgedehnteren Prüfung.

Weiter aber aus dem Befund auf einen Zusammenhang zwischen Harnstoffderivaten und dem Hefeeiweiß zu schließen, wie das in mancher Beziehung verlockend wäre, empfiehlt sich vorläufig gar nicht.

Schon Czapek[1]) hat in einer ausführlichen Untersuchung über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung bei Pflanzen eine große Zahl von Stickstoffverbindungen in bezug auf ihren Nährwert für Aspergillus niger geprüft und besonders auf die Bedeutung der Aminosäuren aufmerksam gemacht. Er kam jedoch nur zu einem Vergleich verschieden konstituierter Stickstoffquellen durch das Gewicht der Pilzernte, während in meinem Befund ein viel schärfer charakterisierter Unterschied zwischen Stickstoffquellen, die eine gärende, und solchen, die eine nicht gärende Hefe geben, hervortritt.

Man muß sich aber auch in der Verwertung meines Resultates in spekulativem Denken über den Eiweißaufbau Beschränkung auferlegen. Ein Zusammenhang zwischen der Konstitution der Stickstoffquelle, speziell zwischen der Wirkung der genannten Gruppe auf die des Eiweiß, und der Lebensfunktion des Protoplasma wird ohne Frage hergestellt. Zwei Einschränkungen müssen gemacht werden. Erstens kommt die Hefe auch zu Vermehrung, d. h. sie baut auch Eiweiß auf, wenn ihr diese Gruppe nicht zur Verfügung gestellt wird; es ist also nicht eine allgemeine Bedingung für den Eiweißaufbau der Hefe, daß die Stickstoffquelle die -NH·CH·CO- Gruppe enthält, sondern nur eine Bedingung für die Fähigkeit des Plasma, gärende Enzyme abzusondern oder die Aktivierung der gebildeten Gärenzyme zu gestatten. Zweitens gestattet die Tatsache, daß nur eine durch die mit der -NH·CH·CO-Gruppe begabte Stickstoffquelle ernährte Hefe gären kann, noch nicht den Rückschluß, daß diese Gruppe dem Plasma der Hefe auch ungespalten durch Verkupplung einverleibt wurde. Gerade dieses aber wäre die Vorbedingung für den logischen Zusammenhang zwischen den synthetischen Versuchen von eiweißartigen Substanzen Fischers und denen der Hefezelle. Eine Entscheidung dieser Frage kann bis jetzt noch nicht gegeben werden. Wenn

---

[1]) F. Czapek. Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie **1**, 538, **2**, 557, **3**, 47. 1902/03.

E. Abderhalden und P. Rona[1]) auch angeben, daß die Eiweißbildung von Aspergillus niger in gewissen Grenzen ganz unabhängig von der Art der Stickstoffquelle ist, da dieser Pilz sein Eiweiß in derselben Weise aufbaut, wenn ihm Kaliumnitrat, Glykokoll oder Glutaminsäure als Stickstoffquelle gegeben wird, und wenn sie daraus schlußfolgern, daß der Pilz die ihm gebotenen Aminosäuren abbaut und dann vom Ammoniak ausgehend der Eiweißaufbau beginnt, so möchte ich doch für die Hefe an eine Einverleibung der ungespaltenen Aminosäurerestgruppe in ihr Eiweiß denken. Denn die Eignung von Stickstoffquellen, welche ein gärkräftiges Plasma geben, steigt, wie aus später gesagtem hervorgeht, so auffallend vom Ammoniumion zum Aminosäurerest und besonders zum Pepton, daß ich an eine Einfügung der Aminosäurerestgruppe bei Aminosäure als Stickstoffquelle und mehrerer ungespaltener solcher gekuppelter Gruppen, welche sich im Pepton finden müssen, bei Pepton als Stickstoffquelle glauben muß.

Bei der Einfügung solcher Gruppen in den Eiweißkomplex der Hefe kann es sich nur um einen Teil der in der Aminosäure gebotenen handeln. Der größere Teil wird für den Aufbau anderer Atomkomplexe, die zum Eiweiß gehören, gespalten. Daß hierbei die -NH-CH-CO-Gruppe zersplittert wird, folgt aus der Ehrlichschen Beobachtung[2]), daß die Hefe aus dem Leucin, der α-Aminoisobutylessigsäure $\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}>CH\cdot CH_2\,CH(NH_2)\,COOH$, einer Aminosäure, welche die genannte Gruppe enthält und welche der Hefe zum Aufbau eines gärkräftigen Plasma dienen kann, bei der Gärung Amylalkohol abspaltet. Diese Überführung von Leucin in Amylalkohol vollzieht die Hefe, wie wir später zeigen werden, auch dann, wenn sie ausschließlich mit Leucin als Stickstoffquelle ernährt wird.

Findet man nun weiterhin im dritten Teil der Arbeit die Angabe, daß die ganze Leucinmenge, die der Hefe als Stickstoffquelle geboten wurde, als Amylalkohol wieder erscheinen kann, so darf man daraus noch nicht den Schluß ziehen, daß auch die dem Leucin angehörige Aminosäurerestgruppe in ihrer Gesamtheit gespalten wurde, ehe sie dem Eiweiß der Hefe einverleibt wurde. Denn

---

[1]) Nach Abderhalden, Lehrbuch der Physiologischen Chemie 236.

[2]) F. Ehrlich, Zeitschr. des Vereins deutscher Zuckerindustrie **55**, 551. (1905).

verfolgt man den Vorgang weiter und ernährt eine Hefe ausschließlich und mit nur sehr geringer Leucinkonzentration, so findet sich in einem meiner Fälle (Teil III, Tabelle III) sogar 192,7 % des gebotenen Leucin in Form von Amylalkohol in der vergorenen Flüssigkeit wieder. Dies kann nur dadurch eine Erklärung finden, daß in solchen Fällen sehr geringer Stickstoffgabe eine mehrfache Ausnutzung derselben Stickstoffmenge durch die Hefe stattfindet, indem der aus der Zelle in Form von Aminosäuren austretende Stickstoff von neuem zum Aufbau des Hefeeiweiß unter teilweiser Einverleibung der Aminosäurerestgruppe, aber bedeutenderer Spaltung dieser unter Bildung höherer Alkohole verwendet wird, wodurch gewissermaßen ein Kreislauf des Stickstoffs aus der Lösung in die Zelle, aus der Zelle in die Lösung und so fort zustande kommt. Auf diese Weise reicht eine geringe Stickstoffgabe zur Bildung von größeren Mengen höherer Alkohole aus, als der Menge der Aminosäure, welcher die Stickstoffmenge angehörte, entsprochen hat.

Diese Ausführungen wurden hier gemacht, um zu zeigen, daß man aus der Bildung von Amylalkohol aus Leucin durch die Hefe noch nicht schlußfolgern darf, daß die -NH-CH-Co-Gruppe nicht ungespalten in das Hefeeiweiß, oder speziell dessen Gärenzyme absondernden Teil, übergeht.

Wie aber auch das theoretische Ergebnis der an der Hefe gewonnenen Resultate in Zukunft Verwendung finden möge, eins steht jedoch schon jetzt fest, daß man auf Grund der gewonnenen Resultate eine biologische Analyse zur Prüfung von stickstoffhaltigen Körpern auf die -NH-CH-CO-Gruppe aufbauen kann. Hier kommt allerdings nicht die Erforschung der Konstitution irgend welcher organischer Verbindung, die vielleicht hefegiftige Komplexe enthält, in Betracht, sondern gerade die von Eiweißabbauprodukten und synthetischen Bausteinen des Eiweiß, die wohl nie Hefegifte sein werden. Aber gerade die Bestimmung der Konstitution dieser Körper kann wegen ihrer außerordentlichen Kompliziertheit durch die gewöhnlichen Methoden der organischen Chemie heut noch nicht erreichbar sein. Verfährt man mit solchen Körpern nun so, daß man sie der Hefe, welche in minimaler Menge eingesät wird, in steriler Zuckerlösung als Stickstoffquelle bietet, so läßt sich durch das Auftreten oder Ausbleiben der Zucker-

vergärung entscheiden, ob die Stickstoffquelle -NH·CH·CO-Gruppe enthielt. Besonders wichtig ist, daß zu dieser Prüfung sehr minimale Substanzmengen genügen, da die Vergärung eines bequem zu beobachtenden Volumens einer Zuckerlösung nur geringe Spuren der Stickstoffquelle erfordert.

Auch die Beobachtung an sich, daß Hefe in Gegenwart von Zucker zum Wachstum kommt, ohne diesen zu vergären, wenn ihr eine der nachher angeführten Stickstoffquellen geboten wird, die die -NH·CH·CO-Gruppe nicht enthält, hat Interesse, da sie bis jetzt noch nicht gemacht worden ist.

Experimenteller Teil[1]).

Stickstoffquellen, welche eine gärungsfähige Hefe geben.

Während die Hefe unter normalen Umständen in Gegenwart von Zucker zur Entwickelung kommt und dabei ihre mit Energiegewinn verbundene Gärtätigkeit entfaltet, gelang es Laurent[2]), sie auch mit anderen Kohlenstoffquellen wie Acetaten, Lactaten, Äpfelsäure, Rechtsweinsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure und deren Salzen, der Milchsäure, Linksweinsäure, Schleimsäure, Fumarsäure, dem Asparagin, der Glutaminsäure, dem Calciumsalz der Glycerinsäure und Glycerinphosphorsäure, u. a. m. zum Wachstum zu bringen. Durch die Abwesenheit von Zucker wird bei diesen Kohlenstoffquellen bedingt, daß keine Gärung einsetzen kann. Dagegen gestatten diese Resultate nicht den Rückschluß, daß die so vorkultivierte Hefe, wenn mit Zucker zusammengebracht, keine Spaltung in Alkohol und Kohlensäure gegeben hätte, d. h. also keine Zymase enthielt.

Zwei in bezug auf diesen Punkt von mir unternommene Versuche deuten darauf hin, daß auch in Abwesenheit von Zucker gewachsene Hefe bei geeigneter Stickstoffnahrung gärkräftig ist. Wurde nämlich nach drei Monate langem Wachstum auf einem Liter Äpfel- resp. Bernsteinsäure mit Leucin als Stickstoffquelle

---

[1]) Eine kurze Zusammenfassung der experimentellen Resultate von Teil I wurde in den Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 4048. 1906. gegeben.

[2]) Laurent, Ann. Soc. belge de Microscopie **14**, 29. 1890.

die überstehende Flüssigkeit durch Abhebern von Hefesatz getrennt und die geringe, mit der Hefe zurückbleibende Flüssigkeitsmenge von etwa 20 ccm mit Zucker versetzt, so fand nach 24 Stunden unter deutlich wahrnehmbarer Gasentwickelung wägbarer Kohlensäureverlust von 0,22 g Kohlensäure bei der Äpfelsäure- und 0,20 g Kohlensäure bei der Bernsteinsäure-Ernährung statt. Wie durch mikroskopische Prüfung festgestellt wurde, hatte zu der Zeit noch keine Sprossung der so alten Hefe stattgefunden. Daß die Intensität der Zuckerspaltung gering war, kann bei den ungünstigen Ernährungsbedingungen nicht wundernehmen.

Immerhin geht aus den Versuchen mit genügender Klarheit das theoretisch wichtige Resultat hervor, daß auch eine in Abwesenheit von Zucker mit einer anderen Kohlenstoffquelle ernährte Hefe ein gärkräftiges Plasma enthalten kann.

Die in der Gärungstechnik verwendeten Maischen und Würzen enthalten das Eiweiß in einem durch den Prozeß des Mälzens und Vermaischens vorbereiteten Zustande. Daß sich schon beim Keimen der Samen Aminosäuren bilden, hat E. Schulze[1]) nachgewiesen. Außerdem werden durch ein im Malz vorhandenes, Eiweiß abbauendes, Enzym sowohl die ungelösten Eiweißkörper der Gerste oder eines anderen Malzes, wie auch die Eiweißprodukte des zu vermaischenden Materials, wie Kartoffeln, Mais usw., in wasserlösliche Spaltungsprodukte und weiterhin in Aminosäuren abgebaut[1]). Wenn wir nun in Betracht ziehen, daß die Hefe bei der Gärung nach Lintner[2]) und Wahl und Hantke[3]) immer mehr Aminostickstoff als Proteinstickstoff aufnimmt, so können wir den Schluß ziehen, daß sie reichlich Gelegenheit hatte, sich bei der Ernährung in solchen Fällen mit der für den Aufbau eines gärungskräftigen Plasmas wichtigen Gruppe -NH·CH·CO- zu versorgen.

Im Zusammenhang mit diesen Beobachtungen ist von Interesse, daß nach Pasteur das Albumin und nach Mayer[4]) das Kasein und Fibrin nicht von der Hefe assimiliert werden, während nach

---

[1]) Vergl. hierzu: F. Ehrlich, Ztschr. des Vereins der deutschen Zuckerindustrie **55**, 551. 1905.

[2]) Lintner, Wochenschrift für Brauerei **1**, 3. 1884.

[3]) Wahl und Hantke, American Brewers Review **7**, 32.

[4]) Nach Duclaux, Traité de Microbiologie **3**, 203.

Thenard und Cholin[1]) beim Stehen einer gezuckerten Albuminlösung nach drei Wochen Gärung eintrat. Durch die Anwesenheit von Bakterien fand hier eine allmähliche Spaltung des Eiweißes statt, das dadurch für die Hefe assimilierbar wurde. In welcher Weise im Albumin, Kasein und Fibrin die für die Hefe wichtige Gruppe gedeckt ist, sodaß sie nicht als Stickstoffquelle Verwendung finden kann, läßt sich noch nicht entscheiden.

Im Gegensatze dazu kann die Diastase als Stickstoffquelle dienen[2]), wenn sie der einzige stickstoffhaltige Bestandteil des Nährbodens ist. Dagegen schwanken die Angaben für das Pepsin je nach seiner Darstellung, während Ptyalin und Pankreatin sich als wirkungslos erwiesen[3]).

Von den organischen Stickstoffquellen mit bekannter Konstitution wurde das Asparagin zuerst von Hayduck[4]) als vortrefflich für die Erzeugung einer gärkräftigen Hefe erkannt. Die Beobachtung wurde von anderen Autoren bestätigt[5]). Weiterhin wirkt in demselben Sinne sehr günstig das Leucin[6]), entgegen den früheren Angaben von Mayer in bezug auf diesen Punkt[7]). Dazu kommt nach Laurent (a. a. O.) das Glutamin.

Bokorny[8]) fand schon nach zwei Tagen eine Vermehrung des Trockengewichtes eines Gramms Hefe von 0,33 g auf 0,40 g mit Glykokoll, 0,52 g mit Tyrosin, 0,61 g mit Leucin und 0,52 g mit Asparaginsäure. Angaben über die Vergärung des Zuckers macht er nicht. Bemerkenswert ist, daß bei Albumose ein Rückgang im Gewicht der Trockensubstanz auf 0,30 g beobachtet wurde.

Von mir wurden nun noch das Glykokoll, Alanin, Leucin und Tyrosin als Stickstoffnahrung für die Zuckervergärung der Hefe geeignet gefunden. Dazu fügte ich noch die Vergärung einer Zuckerlösung mit Phenylaminoessigsäure, Phenylalanin und Hip-

---

[1]) Ebenfalls nach Duclaux, S. 203.

[2]) Heinzelmann, Ztschr. für Spiritus-Industrie **20**, 296. 1897; **21**, 357. 1898.

[3]) Nach Duclaux, a. a. O., S. 204.

[4]) M. Hayduck, Ztschr. f. Spiritus-Industrie **4**, 173. 1881.

[5]) Literatur bei Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie **4**, 103. 1905.

[6]) Nach Ehrlich, a. a. O.

[7]) Ad. Mayer, Untersuchungen über die alkoholische Gärung **1869**.

[8]) Th. Bokorny, Koch's Jahresbericht **18**, 238. 1904.

pursäure als Stickstoffquellen, um zu beweisen, daß die Anheftung einer Phenyl- oder Benzoyl-Gruppe keine Hinderung für die Eignung zum Aufbau eines gärkräftigen Plasmas ist, wenn nur die -NH-CH-CO-Gruppe erhalten bleibt.

Bei der Prüfung mit diesen Substanzen muß man durch Zusatz von Alkali dafür sorgen, daß die Nährlösung eine nur schwach saure Reaktion zeigt. Man findet dann, daß sich die eine Aminosäurerest-Gruppe enthaltenden Körper mit Verlängerung der Kette im allgemeinen besser zum Aufbau des gärkräftigen Plasmas eignen, was sich bei gleicher Impfmenge, gleicher Temperatur und Zuckerkonzentration durch ein schnelleres Einsetzen der Gärung kund gibt. Dabei spielt aber die Anfügung einer Gruppe, wie Phenyl oder Benzoyl, an den Stickstoff an Stelle des Wasserstoffatoms keine Rolle. So gärt eine Leucin- oder Tyrosin-Lösung schon nach ein paar Tagen, während beim Glykokoll, der Hippursäure und der Phenylaminoessigsäure fast zwei Wochen bis zum Einsetzen der Gärung vergangen waren. Alanin und Phenylalanin lagen in ihrer Wirkung in der Mitte. Genauere Zeitangaben sind hier nicht am Platze, da die Gärwirkung einer Hefe, wie ich an anderer Stelle zeigen werde, auch innerhalb geringerer Grenzen sehr von der Konzentration der Stickstoffquelle abhängig ist.

Schließlich entnehme ich den Angaben von Duclaux (a. a. O. S. 205), daß auch Allantoïn, Guanin und Harnsäure zur Vergärung von Zucker verwendbare Stickstoffquellen sind. Auch dem Allantoïn kommt die angeführte Gruppe zu, während Guanin und Harnsäure die ihr naheverwandte -NH-C-CO- enthalten. Harnsäure erwies sich bei meiner Nachprüfung als geeignet.

Fassen wir die angeführten Resultate zusammen, so kommen wir zu dem Schluß, daß alle, bisher zur Erzeugung einer gärkräftigen Hefe tauglich befundenen Stickstoffquellen die Gruppe -NH-CH-CO-, oder die ihr naheverwandte nur mit doppelter Bindung am mittleren Kohlenstoffatom, besitzen.

Nur der Harnstoff soll nach den Angaben einiger Autoren eine Ausnahme machen. Doch fand ihn Beijering[1]) nicht verwendbar. So kann man die älteren Angaben von Mayer und die

---

1) Beijering, Centralbl. für Bakt. **11**, 68. 1892.

neueren von Thomas[1]) wohl darauf zurückführen, daß beim Sterilisieren der verwandten Nährlösungen durch Erhitzen in Gegenwart der z. T. sauren Nährsalze eine teilweise Abspaltung von Ammoniak stattgefunden hatte. Als ich eine Nährlösung, die durch Vereinigung getrennt sterilisierter Zucker-Nährsalz- und Harnstoff-Auflösung erhalten worden war, mit Hefe impfte, trat auch Gärung ein. Die so vorbereitete Harnstoffauflösung zeigte aber schon allein alkalische Reaktion, während eine nicht erhitzte neutral war. Ich stehe daher nicht an, auch hier eine Abspaltung von kohlensaurem Ammonium anzunehmen, wie sie nach den Angaben der Literatur beim Erhitzen von Harnstoff mit Wasser über 100° beobachtet worden ist, zumal die Hefe den Thioharnstoff, der nur schwer hydrolisiert wird, als Stickstoffquelle nicht ausnutzt[2]). Hier wird also das Ammoniak zum Aufbau der gärkräftigen Hefezellen gedient haben; denn das Ammoniak nimmt unter den Stickstoffquellen der Hefe eine Sonderstellung ein. Das Ammoniumion vermag die Hefe zum Aufbau eines gärkräftigen Plasmas zu verwenden. Doch ist diese Ausnahmestellung mit einer Erschwerung für das Assimilisationsvermögen der Hefe verbunden, die sich nach meinen Untersuchungen[3]) erst durch die Gewöhnung an die Ammoniakaufnahme anpaßt.

Stickstoffquellen, welche eine gärungsunfähige Hefe geben.

Die Beobachtung, daß die Hefe, durch die Stickstoffernährung beeinflußt, in Gegenwart von Zucker, ohne diesen zu vergären, zum Wachstum kommt, machte ich zuerst an der Sulfanilsäure.

Ich verwandte für die Prüfung in diesem und allen folgenden Fällen eine zehnprozentige Zuckerlösung, die einen Zusatz von Salzen (0,75 g K_2HPO_4, 0,1 g $MgSO_4$, Spuren von Chlornatrium und $FeSO_4$ pro L) und $^1/_2$ % der zu prüfenden Stickstoffquelle erhalten hatte, sofern letztere bis zu einem solchen Grade löslich waren. War das nicht der Fall, so wurden Säuren durch Zusatz von Natronlauge in ihr Natriumsalz verwandelt, jedoch immer noch die für die Hefe günstige schwach saure Reaktion bestehen

[1]) Thomas, Compt. rend. **133**, 312. 1901.

[2]) Kastle und Elvove, American Chemical Journal **31**, 550. 1904.

[3]) H. Pringsheim, Centralbl. für Bact. (Abt. II) **16**, 111. 1906.

gelassen. Anilin verwandte ich als gesättigte wässrige Lösung und als phosphorsaures Salz. In einem Falle, dem des Diphenylaminsulfates, konnte Hefewachstum erst beobachtet werden, nachdem die Schwefelsäure durch Ausfällen mit Baryumhydroxyd fast ganz beseitigt worden war.

In einer so vorbereiteten Sulfanilsäurelösung entwickelte sich nach ein paar Wochen ein merklicher Hefesatz, wenn die sterile Lösung mit einer Öse Logos-Hefe geimpft wurde. Eine Abgabe von Gas war nicht zu beobachten. Beim Abimpfen dieser Hefe auf Most trat in der gewöhnlichen Zeit von zwei bis drei Tagen Gärung ein. Wurde der Sulfanilsäure-Zuckerlösung eine andere Stickstoffquelle in Gestalt von Pepton, Asparagin, schwefelsaurem Ammonium oder dem später für diese Prüfung von mir immer verwandten Ovos, einem Hefeextraktprodukt, das sich als Nährstoff im Handel findet, zugegeben, so trat Gärung in der zu erwartenden Zeit ein.

Genau diese Erscheinung trat auf, wenn statt Logos-Hefe andere vom Typus Frohberg oder Saaz und eine Weinhefe, Oppenheimer Kreuz, verwandt wurden. Auch ließ sich auf Traubenzuckerlösung bei alleiniger Anwesenheit von Sulfanilsäure als Stickstoffquelle gleichfalls keine Gärung beobachten, sodaß also nicht der Mangel an Invertin die Ursache für das Ausbleiben der Vergärung des Rohrzuckers gewesen war. Weiterhin wurde eine auf 400 ccm steriler Würze herangezogene Logoshefe von der Würze durch Abheben getrennt und in zwei Portionen geteilt. Zu der einen wurden 200 ccm 10 %iger Zuckerlösung mit 0,5 % Sulfanilsäure, zu der andern mit 2 % Sulfanilsäure gegeben. In beiden Fällen trat Gärung ein, die bei der 0,5 %igen Sulfanitsäurelösung nach 5 Tagen bis zu einem Verlust von 9,8 g Kohlensäure, bei der 3 %igen Lösung nach 2 Tagen bis zu 2,2 g Kohlensäureverlust fortgeschritten war. Damit war die Kohlensäureabgabe in beiden Fällen beendet. Man sieht also aus dem Resultat, daß ein Zusatz von ein halb Prozent Sulfanilsäure die Vergärung von 10 % Zucker noch zu Ende kommen läßt, während 2 % schon eine baldige Hemmung bewirkt. Dies darf aber nicht dazu verleiten, von einer gärungsfeindlichen Stickstoffsubstanz zu sprechen, wie das F. Hayduck[1]) in einem Nachwort

[1]) Wochenschr. f. Brauerei **1907**, Nr. 3.

zu meinem Autorreferat tut [1]). Die Giftwirkung auf die Zymase kommt nicht der Stickstoffbindung sondern sicherlich dem in konzentrierter Form vorhandenen Benzolsulfosäurekomplex zu. Auch die allbekannte Erscheinung, daß Hefe sich auf Kosten ihrer eigenen Stickstoffsubstanz vermehren kann, wurde nicht unberücksichtigt gelassen, wie Hayduck annimmt. Schon bei meiner Arbeit über die Biosfrage [2]) hatte ich mich überzeugt, daß beim Beimpfen einer Lösung, die nur Salze und Zucker und keine Stickstoffquelle enthält, mit einer Öse Hefe aus Most kein sichtbarer Hefesatz gebildet wird, ja unter dem Mikroskop nur sehr schwer Hefezellen zu finden sind. Die Hefevermehrung auf Kosten der eigenen Stickstoffsubstanz kann nie mehr als eine Mutterzellensproßung sein. In meinen Versuchen wirkten also die verwandten Stickstoffquellen plasmabildend.

Zuerst wurden nun Substanzen geprüft, welche eine der Sulfanilsäure analoge oder ähnliche Zusammensetzung haben, wie Metanilsäure (*m*-Aminobenzolsulfosäure) und Naphthionsäure (1-4-Aminonaphtalinsulfosäure). Dann ging ich zum unsubstituierten Anilin, frei und als Phosphat verwandt, über. Der Einfluß der Sulfogruppe war also nicht maßgebend. Darauf schaltete ich zwischen den Benzolring und die Amidogruppe eine -CO-Gruppe durch Verwendung von Benzamid und eine -CH-Gruppe im Benzylamin. Weiterhin prüfte ich die $-CO-NH_2$-Gruppe ohne Benzolanhang im Acetamid und die substituierte Phenylamingruppe im Acetanilid. Immer trat in Gegenwart von Ovos Gärung, ohne Ovos schwache Hefeentwickelung ohne sichtbare Gärung ein.

Weiterhin ging ich zum Methylanilin und Diphenylamin als sekundären Aminen über, um schließlich über das tertiäre Amin im Dimethylanilinchlorhydrat zum im Ring enthaltenen Pyridinstickstoff zu gelangen. Eine Änderung wurde auf diese Weise nur in bezug auf die Menge der gebildeten Hefe erlangt.

Das Resultat dieser Beobachtungen wurde dann noch genau geprüft, indem ich nach wochenlangem Stehen der Kulturen eine geringe Menge aus der verwandten Lösung abdestillierte und nach

---

[1]) Vergleiche die Erwiderung: Über gärfeindliche Stickstoffquellen? H. Pringsheim, Wochenschr. f. Brauerei **1907**.

[2]) Centralb. f. Bact. (Abt. II) **16**, 111. 1906.

Lieben auf Alkohol im Destillat prüfte. In keinem Falle erhielt ich eine scharfe Jodoformreaktion, einige Male einen mehr oder minder scharfen Geruch nach Jodoform, der jedenfalls auf eine nur geringe Bildung von Alkohol hindeutet. Auch ist die Annahme gestattet, daß die Hefe aus ihren zahlreich anwesenden toten Zellen im Laufe der Zeit Stickstoffsubstanzen abspaltete, die frisch wachsenden Zellen den Aufbau eines gärungskräftigen Plasmas gestatten würden.

Die Prüfung ließe sich natürlich noch auf eine unbeschränkte Anzahl von organischen Stickstoffverbindungen ausdehnen, die für die Hefe keine Gifte sind. Das Resultat würde dadurch jedoch schwerlich geändert; denn die wichtigsten Gruppen sind in den von mir gewählten Verbindungen enthalten. Komplizierter zusammengesetzte organische Körper würden gewiß zum Aufbau eines gärkräftigen Hefeplasmas noch weniger geeignet sein, wenn sie für diesen Zweck wichtige Gruppierung von Atomen nicht enthalten. Man muß hierbei besonders in Berücksichtigung ziehen, daß ich die der -NH-CH-CO-Gruppe nächststehenden Atomenkomplexe, wie -CH-CO-NH-, C_6H_5-CO-NH-, C_6H_5-NH-CO- und C_6H_5-CH_2-NH-, geprüft habe.

Zieht man noch in Betracht, daß salpetersaure Salze für die Hefe auch keine geeignete Stickstoffquelle sind, so darf man berechtigtermaßen annehmen, daß die sich von ihm ableitenden Nitrokörper und weitere, diesen nahestehenden Verbindungen sich gleichfalls negativ verhalten. Doch bedarf dies noch einer Nachprüfung.

Zum Schluss gebe ich eine Tabelle, welche einen Vergleich zwischen der Zahl der in der Volumeneinheit gebildeten Hefezellen mit verschiedener Stickstoffernährung gestattet, um dadurch zu zeigen, daß das Ausbleiben der Zuckervergärung nicht auf die geringe Zahl der gebildeten Hefezellen zurückzuführen ist. Die Vergleichsresultate mit Hefezahlen, die auf zur Gärung geeigneter Stickstoffquelle erhalten wurden, sind dem zweiten Teil dieser Arbeit entnommen. Ich möchte aber besonders hervorheben, daß die angegebenen Zahlen nur wegen des besagten Grundes angeführt wurden. Sie haben keinen absoluten Wert; denn eine geringe Änderung in der Zuckerkonzentration, der Lüftung, dem Säuregrad oder der Konzentration der Stickstoffquelle hätte sicher einen großen Einfluß auf die Zahl der gewach-

senen Hefezellen gehabt. Der relative Vergleich ist wertvoll, der absolute zweckwidrig!

Vergleich zwischen der Anzahl Zellen in Millionen pro ccm Nährlösung, die gärungsfähiges und gärungsunfähiges Plasma geben.

Nichtgärende Hefe.			Gärende Hefe. Nach Vergärung einer 15 %igen Zuckerlösung			
Acetamid . . .	6,3	Logoshefe	Leucin	0,044 %	23,7	Logoshefe
Pyridinchlorhydrat . . .	2,0	Logoshefe	Asparagin	0,429 %	21,5	Logoshefe
Naphtionsäure .	9,0	Logoshefe	$(NH_4)_2SO_4$	0,047 %	16,4	Logoshefe
Dimethylanilinchlorhydrat .	2,7	Logoshefe	$(NH_4)_2SO_4$	0,757 %	18,7	Weinhefe
Metanilsäure .	1,7	Logoshefe	$(NH_4)_2SO_4$	0,378 %	14,8	Weinhefe

Vergleicht man in der Tabelle die Zahlen der Hefezellen, welche auf verschieden wirkenden Stickstoffnährmedien erzielt wurden z. B. die von 9 Millionen pro ccm bei Naphtionsäure, die keine gärende Hefe gibt, mit 14,8 Millionen pro ccm mit 0,378 % $(NH_4)_2 SO_4$, die eine 15 %ige Zuckerlösung vergoren haben, so sieht man, daß die geringe Zahl der gewachsenen Zellen im Falle der nichtgärenden Hefe nicht für das Ausbleiben der Zuckergärung verantwortlich war. Denn 9 Millionen Zellen pro ccm hätten gewiß zu einer wenigstens teilweisen Vergärung des Zuckers ausreichen müssen, wären sie gärungsfähig gewesen.

Teil II.

Der Einfluß der Stickstoffernährung der Hefe auf den Vermehrungsgrad, die Gärwirkung und den Stickstoffumsatz während der Gärung.

Zusammenstellung der Literaturangaben.

Bei der Vergärung von Zuckerlösungen mit verschiedener Stickstoffernährung der Hefe wurden gewisse Gesetzmäßigkeiten beobachtet, die dazu Veranlassung gaben, deren Ursache außer in der Wachstumsintensität vor allem in der Stickstoffaufnahme aus der Nährlösung zu suchen. Damit wurde ein Gebiet betreten, das sich durch das Zusammenwirken verschiedenartiger Faktoren zu einem recht komplizierten gestaltet. Besonders ist der Austritt von Stickstoff aus der Hefe während der Gärung zu berücksichtigen. Es empfiehlt sich daher zuerst eine kritische Sichtung der Literatur, welche sich auf die angedeutete Frage bezieht, zu unternehmen, zumal eine solche, von einem einheitlichen Standpunkte ausgehende, nicht vorhanden ist. Denn in dem neuen Handbuch von Lafar findet sich mehr eine Aneinanderreihung von Tatsachen als ein Vergleich der gewonnenen Resultate, während das überdies hauptsächlich französische Veröffentlichungen berücksichtigende Buch von Duclaux durch neuere Arbeiten überholt ist.

Die Schlußfolgerungen aus den Angaben der einzelnen Arbeiten in der Literatur sind oft widersprechend und zum Teil Vergleiche unter ganz verschiedenen Bedingungen unternommener Experimente. Vor allem ist schon durch ein Zusammenwerfen verschiedener Begriffe, welche gewisse Funktionen der Hefe bezeichnen sollen, viel Unklarheit entstanden. Es empfiehlt sich daher, zuerst eine Festlegung dieser für die Zwecke der folgenden Arbeit zu unternehmen. Am klarsten ist die Bezeichnung Gärkraft für die von fertig gebildeter Hefe in der Zeiteinheit entwickelten Kohlensäuremenge, die natürlich ein Maß für die Alkoholproduktion und Zuckerzersetzung ist. Wird diese Bestimmung in der Praxis, speziell zur Bewertung der Preßhefe angewandt, so

ist ein einheitliches Hefegewicht und die Zeitdauer festgelegt; man spricht dann von der **Triebkraftbestimmung**!

Die Kohlensäureentwicklung kann nun mit größerer oder geringerer Schnelligkeit stattfinden, die Wirkung der Hefe kann energischer oder weniger energischer sein. Der Ausdruck Gärwirkung soll daher die Schnelligkeit der Zuckerzersetzung durch eine fertig gebildete Hefe bezeichnen. Die Gärkraft ist allerdings von der Gärwirkung in gewissem Maße abhängig. Doch kann das Resultat der Gärkraftbestimmung durch eine verschiedene Gärwirkung unbeeinflußt gelassen werden, wenn z. B. langsamere Anfangswirkung durch größere Wirkung in einem späteren Stadium kompensiert wird.

Wird Hefe in geringer Aussaat in eine zuckerhaltige Nährlösung gebracht, so entfaltet sie auch eine Gärwirkung, d. h. sie zersetzt den Zucker schneller oder langsamer. Diese Zersetzung hängt nun aber nicht wie im früheren Falle von der Wirkung einer bestimmten Hefemenge auf den Zucker ab, sondern sie wird auch beeinflußt durch die Menge der unter den gegebenen Bedingungen gebildeten Hefezellen. Hier wird also die Gärwirkung außerdem noch durch die Wachstumsintensität der Zellen beeinflußt. Die Schnelligkeit der Zuckerzersetzung durch eine sich aus kleiner Aussaat in einer Lösung entwickelnde Hefe soll daher „**Gärwirkung wachsender Hefe**“ genannt werden. Im letzteren Fall kann auch noch die Wirkung der Zellen, welche gewachsen sind, eine verschiedene sein. Denn die in einem späteren Stadium entstandenen Zellen finden weniger Stickstoff in der Lösung als die, welche sich zuerst entwickelt haben. Dies kann in stickstoffarmer Lösung einen Unterschied im Stickstoffgehalt der Zellen und damit eine verschiedene Gärwirkung dieser bedingen.

Spricht man schließlich vom **ökonomischen Faktor**, so soll damit der Effekt bezeichnet werden, den die Zelleneinheit auf die Zuckerspaltung hervorruft.

Bei der Besprechung der vielen Arbeiten über diese Beziehungen soll zuerst auf die allgemeinen Grundzüge der Stickstoffbewegung während der Gärung eingegangen werden, woran sich dann die der einzelnen Momente anschließt, welche sie beeinflussen.

Allgemeine Grundzüge der Stickstoffbewegung während der Gärung.

Die ersten Erfahrungen über den Stickstoffgehalt und die Stickstoffernährung der Hefe, von der Zeit Kunkels an, der fand, daß die Hefe Stickstoff enthält, sind, soweit sie sich noch auf zweifelhafte Analysenmethoden gründen, bei Duclaux[1]) gewürdigt, so daß ich auf die ersten Seiten seines Kapitels über die Stickstoffernährung der Hefe verweisen kann. Schon Thénard[2]) fand in der Hefe „eine animalische Substanz", welche stickstoffhaltig war und bei der Destillation viel Ammoniak abgab. Die Zerspaltung des Zuckers war immer von einem Verlust an dieser Substanz begleitet, die sich in lösliche Produkte umwandelte. Mitscherlich[3]) bestätigte das und fand, daß der Stickstoffgehalt der Hefe während der Gärung in reinem Zucker von 10 % auf 5 % sank. Hier muß gleich bemerkt werden, daß sich solche Angaben nur auf die Verminderung des Stickstoffgehaltes der Hefetrockensubstanz und nicht auf den Verlust an Gesamtstickstoff der Hefe beziehen.

Liebig[4]) sah in der alkoholischen Gärung, im Zusammenhang mit einer spontanen Zersetzung oder Dissoziation der eiweißartigen Substanzen der Zelle, eine molekulare Bewegung, welche sich auf den Zucker überträgt; Nägeli[5]) beobachtete ebenfalls eine Eiweißausscheidung der Hefe während der Gärung; er hielt sie jedoch nicht für die Ursache, sondern für die notwendige Folge der Gärung.

Auch Pasteur[6]) hielt einen Eiweißumsatz für eine notwendige Folge der Gärung. Er fand weiter, daß mit Wasser aufgeschwemmte Hefe eiweißartige Substanzen an dieses abgibt, die beim Einimpfen neuen Zellen zum Wachstum und zur Zuckervergärung dienen können und außerdem, daß der Stickstoffgehalt der Hefe sich während der Gärung verminderte z. B. von 9,77 % auf 5,5 %, wenn man reine Zuckerlösung mit Hefe vergärt. Ja, er nahm schon an,

---

[1]) Duclaux. Traité de Microbiologie **3**, 186. 1900.

[2]) Nach Schützenberger. Die Gärungserscheinungen. **31**, 117. 1876.

[3]) Nach Ad. Mayer. Die Gärungschemie. **1902**. 139.

[4]) Liebig. Ann. d. Chemie und Pharm. **153**, 1. 1870.

[5]) Nägeli. Theorie der Gärung. **1879**. 93—109.

[6]) Pasteur. Annales de Chimie et de Physique (Serie III). **58**, 397. 1860.

daß eine in Gegenwart eiweißartiger Substanzen wachsende Hefe in der Lösung stickstoffhaltige Substanzen zurückläßt, die sich zusammensetzen aus den während der Gärung unverbrauchten und den während der Gärung ausgeschiedenen Mengen dieser (a. a. O. 404). Substanzen. Als Grund für die Verminderung des Stickstoffgehaltes der Hefe nach der Gärung gab er zwei Momente an, die in wörtlicher Übersetzung lauten: 1. Gewichtsvermehrung durch den Zucker, 2. Gewichtsverminderung durch das Löslichwerden gewisser „stickstoffhaltiger Prinzipien" der Hefe.

Delbrück[1]) konstatierte, daß durch die Gärung der Gehalt der Maische an gelöstem Stickstoff resp. an gelösten stickstoffhaltigen Substanzen abgenommen hat, und daß die absolute Menge der gebildeten Hefe nicht vom Zucker, sondern von der Quantität des gelösten Stickstoffs abhängt. Er verfolgte die Abnahme des Stickstoffs in der Maische, schloß aus ihr auf die Hefevermehrung und stellte daraus den wichtigen Satz auf, daß Hefewachstum und Gärwirkung der Hefe praktisch in durchaus keinem Verhältnis zueinander stehn.

Dies stimmt mit den Resultaten Hayducks[2]) überein, der die Hefevermehrung in gärender Spiritusmaische im allgemeinen bei Beginn der Hauptgärung beendet fand. Eine Bestätigung fanden letztere Resultate durch Mohr[3]) und Schönfeld[4]).

Weiterhin fand Delbrück (a. a. O. S. 349), daß bei der Nachgärung eine Zunahme an gelöstem Stickstoff stattfindet, die er dann als das Resultat der Hefeselbstzersetzung ansprach. Er erwähnt schon, daß man den Beginn der Hefeselbstzersetzung nicht genau fixieren könne, da der durch sie eintretenden Stickstoffverarmung durch Stickstoffaufnahme während der Gärung das Gleichgewicht gehalten werden kann. Auch erkannte Delbrück schon, daß dieser Stickstoffaustritt aus der Hefe keine krankhafte Erscheinung ist, sondern daß er auch besonders zur Erreichung einer völligen Vergärung des gebotenen Zuckers beitragen könne.

Man hätte nun meinen sollen, daß die Erkenntnis der wichtigen Tatsache des Stickstoffaustritts aus der Hefe während der Gärung bei allen Untersuchungen Berücksichtigung finden würde,

---

[1]) Delbrück, Ztschr. f. Spiritus-Industrie **13**, 337. 1879.

[2]) M. Hayduck, Ztschr. f. Spiritus-Industrie **14**, 174. 1880.

[3]) Mohr, Wochenschr. f. Brauerei **8**, 210. 1896.

[4]) F. Schönfeld, ebda. S. 421.

die sich mit der Ausnützung einer der Hefe gebotenen Stickstoffquelle befassen. Die bloße Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Hefe nach der Gärung oder des Stickstoffverlustes der vergorenen Flüssigkeit führt also nur zu der Erkenntnis eines Faktors, der nichts bestimmtes über die Ausnutzung des der Hefe ursprünglich gebotenen Stickstoffs aussagt, mit der doch Wachstumsenergie und Gärwirkung in Beziehung gebracht werden sollte, eines Faktors von geringer Bedeutung, dessen Befund dazu noch von einer Reihe anderer Einflüsse wie Temperatur, Lüftung, Zuckerkonzentration abhängig ist. Daß nichtsdestoweniger eine Reihe von Forschern, die nicht unter Delbrücks Einfluß standen, Arbeit daran gewandt hat, diesen Faktor zu bestimmen, ist zu verwundern, zumal sie sich meist nicht mit der Stickstoffaufnahme der Hefe aus günstigen Nährmedien wie Bierwürze und Maische beschäftigten, in denen bei schnellem Wachstum und baldiger Erledigung der Vergärung die Hefe wenig Zeit finden könnte Stickstoff in die Lösung zu entlassen, sondern mit Lösungen der für die Hefe weniger günstigen Stickstoffquellen arbeiteten, unter Verhältnissen, bei denen die Hefe sich das Fortkommen sicher durch Ausscheidung leichter assimilierbarer Eiweißzerfallprodukte erleichtert, wie ich späterhin zeigen werde.

Andererseits ist die Verfolgung der Stickstoffbewegung bei der Gärung ebenso schwierig wie bedeutungsvoll. Denn erstens stehn uns bis dato keine Methoden zur Verfügung. um das Verschwinden so komplizierter stickstoffhaltiger Gemische, wie gerade die wichtigsten Gärflüssigkeiten, wie Maischen und Würze enthalten, analytisch zu verfolgen. und zweitens hat man genügende Beweise aus der Kenntnis des Zerfalls des Hefeeiweiß, um sicher zu sein, daß z. T. dieselben stickstoffhaltigen Produkte, die der Hefe zum Aufbau ihrer Leibessubstanz geboten werden, während der Gärung auch wieder aus ihr austreten [1]).

Man muß sich daher in solchen Fällen mit Annäherungsresultaten begnügen. Das hat Lintner [2]) getan. Er ermittelte, ob die Hefe aus einer Würze mehr Proteïnstickstoff oder Amidstickstoff aufnimmt, wobei er als Proteïnstickstoff den durch Phosphorwolframsäure fällbaren ansprach. Er macht darauf auf-

---

[1]) Vergl. hierzu P. Lindner, Wochenschr. f. Brauerei **22**, 528. 1905.
[2]) Lintner, Wochenschr. f. Brauerei **1**, 3. 1884.

merksam, daß nach Nägeli und Hayduck aus der Hefe Stoffe während der Gärung austreten, welche durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, bemerkt aber dann: „Während indessen diese Ausscheidungen bei reiner Asparaginernährung in sehr hochprozentiger (20 %) Zuckerlösung und bei starker Hefeaussaat sehr bedeutend (bis zu 50 % des ursprünglich vorhandenen Stickstoffs) werden können, sind dieselben bei 10—12 prozentiger Zuckerlösung und geringer Hefeaussaat nahezu verschwunden.

Deshalb verwendet er nie mehr als 10 % Zucker und 2,5 g Hefe auf 500 ccm, sodaß die Ausscheidung gering und der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Anteil Amide sind, die in der Nährlösung vorhanden waren.

Er sagt dann weiter: „Wenn nun die nachstehenden Versuchsresultate am Ende kein Bild geben über die Art der Stickstoffbewegung bei der Gärung, so erteilen sie doch darüber Aufschluß, wie viel Stickstoff aus jeder Gruppe fixiert d. h. von der Hefe assimiliert wurde. Die Versuche lassen also wohl darüber im unklaren, wie viel z. B. Amide in den Stoffwechsel der Hefe hineingezogen wurden, sie geben aber an, wie viel von der Hefe aus der Nährflüssigkeit entnommen dazu diente, das Gewicht der Hefe zu vermehren und eventuell ihren Stickstoffgehalt zu erhöhen. Die Abfassung des letzten Satzes ist etwas unklar, da man nicht sehen kann, wie Amide in den Stoffwechsel der Hefe gezogen werden konnten, ohne daß sie von der Hefe aus der Nährflüssigkeit entnommen wurden.

Auf Grund dieser Bestimmungsmethode ergab sich, daß die Hefe immer mehr Amid- als Proteïdstickstoff aufnimmt. Zu demselben Schluß kamen Wahl und Hantke[1]). Für den Grund hält Lintner die leichtere Diffundierbarkeit des Amidstickstoffs in die Hefezelle hinein.

Bei künstlicher Kombination von Pepton und Asparagin fand er dasselbe Resultat. Die Hefeernte war hier in allen Fällen die gleiche, nämlich ca. die vierfache Menge der Aussaat. Demgemäß ist die in reinem Pepton gezogene Hefe ärmer an Stickstoff als die Asparaginhefe. Das Amid steigerte den Stickstoffansatz bedeutend gegenüber dem Pepton, von reinem Asparagin wurde 53,7 % von reinem Pepton 34,4 % aufgenommen.

---

[1]) American Brewers Review **7**, 32.

Von großer Wichtigkeit sind weiterhin M. Hayducks[1]) Resultate über die Entwicklung der Hefe in Nährlösungen von verschiedenem Stickstoffgehalt. Da in natürlichen Gärflüssigkeiten der Stickstoff nur z. T. in Form assimilierbarer Körper vorhanden ist, wählt er als Stickstoffquelle das Asparagin. Durch Erhitzen mit konz. Schwefelsäure in Druckflaschen und nachherige Bestimmung des daraus gebildeten Ammoniaks konnte er die Menge des nach Beendigung der Gärung noch unzersetzt vorhandenen Asparagins bestimmen. Diese subtrahiert von der Gesamtstickstoffmenge der Lösung nach der Gärung gab den von der Hefe ausgeschiedenen Stickstoff, allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die Hefe keinen Stickstoff oder nur eine ganz geringe Menge in Amidform ausscheidet, was Hayduck unerwähnt läßt.

Folgendes sind die Resultate dieser Versuchsanstellung:

1. In wenig Stickstoff enthaltenden Lösungen entstehen Hefen von konstantem, minimalem Stickstoffgehalt, während die Hefemengen, die hierbei entstehen, dem Stickstoffgehalt der Lösung proportional sind.

2. Bei höherem Stickstoffgehalt der Lösungen bleiben die Hefeernten konstant, der Stickstoffgehalt wächst aber proportional dem Stickstoffgehalt der Lösungen.

3. Der in einer Lösung enthaltene Stickstoff wird nur bis zu einer gewissen Konzentrationsgrenze von der Hefe völlig assimiliert und der über diese Grenze hinaus in Form von Nährstoffen zugesetzte Stickstoff für die Hefeproduktion nicht verwertet.

4. Die Stickstoffausscheidung durch die Hefe nimmt mit steigendem Stickstoffgehalt der Nährlösungen, mit der Dauer der Gärung und der Erhöhung der Gärtemperatur zu.

Auch Bauer[2]) fand, daß die Vermehrung der Stickstoffmengen über ein gewisses Maß hinaus bei sonst gleichen Bedingungen keine Vermehrung, sondern nach ihm sogar eine Verminderung der Hefeausbeute bewirkt. Dagegen stieg auch hier die Schnelligkeit der Gärung als Folge der durch die reichlichere Stickstoffernährung erhöhten Gärkraft der Hefe. Dagegen war auch bei ihm die Stickstoffmenge für die Gärkraft weniger entscheidend als die Verschiedenheit der Form der gebotenen Stickstoffquelle.

---

[1]) M. Hayduck, Ztschr. f. Spiritus-Industrie **1881,** 173.

[2]) Bauer, Ztschr. f. Spiritus-Industrie **24,** 309. 1901.

Ebenso zeigt sich nach Brown[1]), daß die Erhöhung der Menge der Nährstoffe, die als Stickstoffquellen in Form von Hefewasser, Asparagin und Fleischpepton geboten wurden, über eine gewisse Grenze hinaus die Intensität der Hefevermehrung, in diesem Falle die mit der Zählkammer ermittelte Hefezahl, nicht weiter erhöht. Diese Grenze lag für den Zucker bei 5 %. Unter dieser Grenze steht die Hefevermehrung nicht im direkten Verhältnis zur wachsenden Menge von Kohlenhydrat oder Stickstoffnahrung, sondern in einem höheren.

Besonders wichtig ist Hayducks weitere Beobachtung, daß mit steigendem Stickstoffgehalt der Hefe eine Zunahme der Gärkraft zu beobachten war. Genau definiert heißt Gärkraft hier die durch 5 g gepreßter Hefe in 400 ccm einer 10 % igen Zuckerlösung in 24 stündiger Gärung bei 30° C. entwickelte Kohlensäuremenge. Es handelt sich also um die Energie der Zuckerzersetzung einer fertig gebildeten Hefe von bestimmtem Stickstoffgehalt und nicht um den Einfluß des Stickstoffgehaltes einer in einer Zuckerlösung wachsenden Hefe auf dessen Vergärung, wie von späteren Autoren angenommen wurde.

Aus diesem Grunde ist auch die Kritik, welche Wijsmann[2]) an der Hayduckchen Beobachtung über die Gärkraft von Hefe mit bestimmtem Stickstoffgehalt geübt hat, ungerechtfertigt. Daß der Anfangsgehalt der Trockensubstanz einer Hefe, von der 10 g in 1 Liter Würze gebracht wurde, von 7,09 % Stickstoff nach einer Stunde auf 9,90 %, nach zwei Stunde auf 9,60 % und nach drei Stunden auf 9,55 % stieg um später wieder abzufallen und z. B. in einem Falle nach acht Stunden auf 6,70 % zurückzugehen, ist nur eine Bestätigung der Delbrückschen Beobachtung und widerspricht in keiner Weise den von Hayduck konstatierten Tatsachen.

Ebensowenig ist zu verwundern, daß der Prozentgehalt der Hefe an Stickstoff in 0,25 %iger Asparaginlösung in Leitungswasser und 0,1 % Kaliumsulfat nach zwei Stunden 21 Minuten von 6,88 % in Abwesenheit von Zucker auf 8,10 % stieg, um dann wieder abzufallen und in Gegenwart von 3 % Zucker auf 9,28 % stieg, um sich bis zur fünften Stunde konstant zu erhalten. Denn

---

[1]) Kochs Jahresbericht **1**, 58. 1890.

[2]) Wijsmann, Wochenschr. f. Brauerei **1891**, Nr. 37.

ohne Zuckergegenwart muß die Lebensenergie der Hefe bald nachlassen und eine Lebensverlängerung auf Kosten der mit dem Stickstoffzerfall ihres Eiweiß verbundenen Atmung eintreten, während bei Zuckergegenwart bis zur fünften Stunde Wachstum und Stickstoffaufnahme erfolgte.

H. Lange[1]) untersuchte späterhin den Einfluß verschiedener Ernährung auf die Gärkraft der Hefe. Er züchtete die Hefe in Nährlösungen, die zur Hälfte aus gehopfter Bierwürze und einer Rohrzuckerlösung bestanden, die neben Salzen für 500 ccm 1) 7 g Pepton, 2) 5 g Pepton + 2 g Asparagin, 3) 2 g Pepton und 5 g Asparagin, 4) nur 7 g Asparagin enthielten.

Die Gärkraft dieser Hefe stieg vom Pepton bis zum reinen Asparagin an, was durch die Resultate von Lintner, welche aussagen, daß mit Asparagin gezüchtete Hefe stickstoffreicher als mit Pepton gezüchtete ist, und die von Hayduck, der erkannte, daß stickstoffreichere Hefe eine größere Gärkraft entfaltet, gut übereinstimmt.

Ein falsches Bild von der Stickstoffbewegung in der Hefe gibt auch die abstrakte Abfassung des Satzes, den Duclaux[2]) über diesen Punkt aufstellt, wenn er sagt: „Sei es, daß das Gewicht der trockenen Hefe sich vermehrt oder vermindert, das Gesamtgewicht des organischen Stickstoffs, den sie am Ende der Gärung enthält, ist immer niedriger als das, welches in ihr am Anfang zu finden war". Er kommt zu diesem falschen Schluß beim Vergleich von drei der verschiedenen Autoren, Pasteur, Duclaux und Schützenberger, gefundenen Resultate. Pasteur vergor eine große Zuckermenge (100 g) mit geringer Hefemenge 1,198 g ohne Zugabe einer neuen Stickstoffquelle. Bei der langsamen Gärung vermindert sich naturgemäß das Hefegewicht unter Entlassung von Stickstoff in die Lösung. Schützenberger vergor 100 g Zucker mit großer Hefegabe (13,85 g), wobei, bei Beendigung der Gärung in wenigen Stunden, ein Rückgang im Hefegewicht unter Abgabe von Stickstoff in die Lösung stattfand. Hier war aber infolge der Kürze der zur Vergärung nötigen Zeit nur ein geringer Rückgang des Stickstoffgehaltes zu verzeichnen. Duclaux stellte nun den Versuch so an, daß er nur 40 g Zucker mit 2,501 g Hefe vergor; die Gärung war dabei regelmäßig und schnell. Die Anwe-

[1]) H. Lange, Wochenschr. f. Brauerei 1899, 49.

[2]) A. a. O. S. 209.

senheit von 0,152 g Stickstoff in der Lösung als weinsaures Ammoniak ließ in der Tat das Resultat ganz unbeeinflußt. Dieses Resultat hängt aber auch von der Beschaffenheit der Hefe ab. Denn wie die Untersuchung zeigen wird, ist der Gesamtstickstoffgehalt einer Hefe bei großer Aussaat nach der Gärung in Gegenwart assimilierbarer Stickstoffsubstanzen vermindert oder auch vermehrt, je nachdem man eine stickstoffreiche oder stickstoffarme Hefe verwandte.

Auch hier trat Zunahme des Stickstoffgehaltes der Lösung ein. In diesem dritten Falle seines eigenen Experimentes hat aber Duclaux den Grund für die Nichtabnahme des Stickstoffgehaltes der Lösung übersehen. Die Menge der von ihm verwandten Hefe verglichen mit der Zuckergabe war immer zu groß, als daß Vermehrung hätte eintreten können. Es trat Rückgang des Hefegewichtes ein. Hätte Duclaux weniger Hefe verwandt oder Pasteur bei seiner Versuchsanstellung der Lösung Stickstoff in assimilierbarer Form hinzugefügt, dann hätte sich ohne Frage der Stickstoffgehalt der Nährlösung vermindert, und er hätte den Prozentgehalt des Stickstoffs der Hefe für die erste Periode der Gärung bei Aussaat stickstoffreicher Hefe konstant oder bei Aussaat stickstoffarmer Hefe vermehrt gefunden.

Der Duclauxsche Satz von der Verminderung des Gesamtgewichtes des Stickstoffs der Hefe während der Gärung ist daher in seiner allgemeinen Fassung nicht aufrecht zu erhalten.

Zusammenfassend lassen sich die bisher besprochenen Beobachtungen also so verallgemeinern. Bei geringer Aussaat entzieht die wachsende Hefe der Lösung den Stickstoff. Kommt das Wachstum zum Stillstand oder wird es stark vermindert, dann erfolgt Austritt von Stickstoff aus der Hefe in die Lösuug. Dabei wird fürs erste noch nicht entschieden, ob nicht schon mit Eintritt der Gärung ein Teil der älteren Hefezellen Stickstoff in die Nährlösung entläßt, dessen Austritt sich unserer Beobachtung nur dadurch entzogen hat, daß er durch die Aufnahme von Stickstoff aus der Lösung durch die sich noch reichlich vermehrende Hefe übertroffen wird. Daß das der Fall ist, werde ich späterhin zu zeigen Gelegenheit haben.

Deshalb ist nur natürlich, daß Hefe, die durch zu große Einsaat am Wachstum verhindert wird, wofür Brown[1]) den Grund im

[1]) A. J. Brown, Journ. of the Chem. Soc. **87**, 1395. 1905.

Sauerstoffmangel findet, einen Teil ihres Stickstoffs an die Nährlösung verliert, was sich in stickstofffreier Lösung bequem beobachten ließ.

Hervorgehoben muß aber werden, daß bis jetzt über den Einfluß, den geringe oder große Stickstoffgabe oder die Form der Stickstoffnahrung auf die Gärung bei geringer Aussaat und wachsender Hefe hat, noch nichts ausgesagt wurde. Die darauf bezüglichen Arbeiten werden im folgenden besprochen.

Nachdem die allgemeinen Grundzüge der Stickstoffbewegung während der Gärung erörtert sind, muß jetzt in das Studium der einzelnen Faktoren eingetreten werden, die die Stickstoffaufnahme, die Gärung und das Wachstum beeinflussen, wie die Zuckerkonzentration, die Hefesorte, die Lüftung, die Temperatur und die Wirkung kombinierter Stickstoffquellen. Schließlich muß noch das Verhalten der Eiweißstoffe während der alkoholischen Gärung eine spezielle Erörterung finden.

Der Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Stickstoffentnahme aus gärenden Flüssigkeiten.

Um den Einfluß des Zuckers auf die Stickstoffentnahme durch die Hefe zu prüfen, setzte O. Reinke[1]) zu einer Würze von bekannter Zusammensetzung verschiedene Volumina von Rohrzuckerlösung und fand bei 24° R. wie bei 5 bis 8° R. eine Erhöhung der Hefeausbeute und der Stickstoffentnahme im Verhältnis zur unverdünnten Würze durch die sich vermehrende und gärende Hefe. Dagegen war infolge der Verminderung der Stickstoffkonzentration der Prozentgehalt der Hefe an diesen in Übereinstimmung mit Haydućks Resultaten vermindert. Bei Zusatz des doppelten Volumens Rohrzuckerlösung sank er von 7,42 auf 5,21%.

Das theoretische Ergebnis dieser Versuche ist also wieder, daß die Hefe über ein gewisses Maß hinaus nicht durch die Anwesenheit von assimilierbarem Stickstoff beeinflußt wird, daß man zu einer besonderen Ausnutzung des vorhandenen Stickstoffüberschusses kommt, wenn man der Hefe durch Volumensvermehrung

---

[1]) Mitgeteilt von Delbrück, Korrespondenz des Vereins Versuchs- und Lehranstalt für Brennerei in Berlin 1888, 35.

der Nährlösung größere Wachstumgelegenheit gibt, bis diese schließlich so groß wird, daß die Hefe zwar weiter wächst, aber ihre Leibessubstanz nicht mehr so reichlich mit Eiweißkörpern versorgen kann.

Thomas[1]) studiert nicht wie Reinke die mit einer gegebenen Stickstoffmenge erreichbaren Hefeausbeute, sondern den Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Ausnutzung einer im Überschuß vorhandenen Stickstoffquelle durch die Hefe. Nachdem er sich an den Resultaten früherer Autoren, die nicht genannt werden, die Kritik erlaubt hat, daß sie den Einfluß der Stickstoffernährung einerseits auf das Wachstum, andererseits auf die Gärung nicht genug auseinander hielten, will er letztere durch Lüftung, d. h. Vergärung in flacher Schicht, die Menge der Hefeaussaat und die Zuckerkonzentration unterdrücken. Wie ihm das durch die beiden letzten Faktoren gelingen konnte, ist unklar. Er unterläßt überdies die Angabe der benutzten Hefe und verwandte zu seinen Versuchen für die Hefe die ungeeignete Stickstoffquelle, den Harnstoff und das phosphorsaure Ammoniak. Nach meinen Untersuchungen[2]) ist Harnstoff überhaupt keine zum Aufbau eines gärkräftigen Plasmas geeignete Stickstoffquelle. Nur dadurch, daß sich beim Erhitzen von Harnstoff kohlensaures Ammoniak abspaltet, kommt die Hefe mit Ausnutzung dieser zur Vergärung des ihr gebotenen Zuckers. Schließlich hält Thomas die in der Hefe gefundene und durch ihn nach dem Trocknen bei 105° darin bestimmte Stickstoffmenge für die ganze Menge, welche die Hefe aus der Lösung aufgenommen hat. Die Stickstoffabgabe der Hefe an die Lösung, die bei ungünstiger Stickstoffquelle so groß ist, wird ganz unberücksichtigt gelassen.

Die Resultate faßt er folgendermaßen zusammen:

1. Harnstoff wird bei 10% Zucker schlecht angegriffen und gestattet nur schwache Vergärung. Die Hefeernte ist arm an Stickstoff.

2. Bei 20% Zucker unter sonst gleichen Bedingungen ist die Gärung stark, die Hefeernte größer und stickstoffreicher.

3. Bei steigender Stickstoffgabe erreicht das Hefegewicht und der Stickstoffgehalt der Hefe ein Maximum, das eine gewisse Grenze nicht übersteigt.

---

[1]) Thomas, Comptes rendus **133**, 312. 1901.

[2]) H. Pringsheim, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 4048. 1906.

3. Bei Verwendung von Ammoniumphosphat statt Harnstoff gelten dieselben Regeln, nur waren die Hefemenge und der Stickstoffgehalt der Hefe bedeutend höher.

(Hier findet sich also beim phosphorsauren Ammoniak eine naturgemäße Übereinstimmung mit Hayducks Resultaten über das Asparagin.)

Der gesteigerte Effekt im Resultat 4 bestätigt meine Auffassung, daß es sich beim Harnstoff nur um die Ausnutzung der geringen Menge von kohlensaurem Ammoniak gehandelt hat, die aus ihm durch Erhitzen entstanden war. So war in Wirklichkeit bei den Versuchen mit Harnstoff eine geringere Menge Ammoniak geboten worden, als bei denen mit phosphorsaurem Ammoniak.

Aus den Variationen der angegebenen Resultate kommt Thomas zu dem Schluß, daß der Stickstoffgehalt der Hefe ein schwankender ist und nicht, wie Hayduck angab, im direkten Verhältnis zur Gärkraft steht. Er wirft also die Begriffe durcheinander und vergleicht seine Ernährungsversuche der Hefe mit der Wirkung einer fertig gebildeten Hefe von bestimmtem Stickstoffgehalt auf die in der Zeiteinheit durch sie entwickelte Kohlensäuremenge.

J. Archleb[1]) fand als Einfluß der Zuckerkonzentration auf das Hefegewicht ein Anwachsen von 1 bis 5 % Zucker, von 5 bis 10 % nur geringes von 10 bis 14 % bedeutendes Anwachsen, von 14 bis 19 % einen merklichen Abfall und von neuem Zunahme von 19 bis 25 % Zucker.

Diese Resultate wurden von Stern[2]) erweitert. In zwei Versuchsreihen bestimmte er nach 7 und 10 Tagen den Einfluß von wachsender Traubenzuckerkonzentration von 0 bis 30 % resp. von 0 bis 22,5 % bei 25° C. und einer Aussaat von 1,5 Zellen pro $^1/_{4000}$ cmm auf das Gewicht des Stickstoffs der Hefeernte, ihren Prozentgehalt an Stickstoff und die Menge des vergorenen Zuckers. In einer Tabelle stellt er die Resultate mit 1,5 g Asparagin für 500 ccm Lösung, in einer anderen die für 0,75 g Asparagin für dieselbe Volumeneinheit zusammen.

Die hierzu gehörigen Resultate faßt er folgendermaßen zusammen:

---

[1]) J. Archleb, Ztschr. f. Spiritus-Industrie **11**, 243. Zitiert nach Stern.

[2]) Journ. of the Chem. Soc. **79**, 943. 1901.

1. Eine Vermehrung von Stickstoff oder anorganischer Nahrung über ein gewisses Maß hinaus vermehrt weder die Menge des assimilierten Stickstoffs noch das Hefegewicht. Diese Grenze ist nur wenig größer als die größte Menge, die die Hefe unter den Versuchsbedingungen assimilieren kann.

2. Eine Vermehrung des Zuckers wird von einer Vermehrung des assimilierten Stickstoffs und des Hefegewichts begleitet. Diese Vermehrung steigt bis zur höchsten Konzentration, die völlig vergoren werden kann. Der Zuwachs des Stickstoffgehaltes steigt bei niederen Konzentrationen intensiver als bei höheren.

Diese Resultate decken sich mit denen von Hayduck und Thomas. Man muß nur wieder in Berücksichtigung ziehen, daß auch Stern die zu einem gewissen Zeitpunkt in der Hefe enthaltene Stickstoffmenge für die ganze der Nährlösung als Asparagin entzogene anspricht und die Ausscheidung des Stickstoffs aus der Hefe unberücksichtigt läßt.

Für mich war an Sterns Resultaten noch von Interesse, daß nach sieben Tagen bei der höheren Stickstoffgabe von 1,5 g Asparagin pro 500 ccm mehr Gesamtstickstoff in der Hefeernte vorhanden war als bei 0,75 g Asparagin bis zu einer Konzentration von 15 % Zucker. Oberhalb dieser Zuckerkonzentration reversiert sich das Verhältnis. Man sieht daraus, daß man den Einfluß der Stickstoffgabe auf den Stickstoffgehalt der Hefeernte nicht ohne Rücksicht auf die Zuckergabe verallgemeinern darf.

Wertloser werden Sterns Resultate, wenn er die zeitliche Stickstoffmenge der Hefeernte mit dem zur selben Zeit vergorenen Zucker einer 10%igen Glukoselösung vergleicht, da sie eben nicht der assimilierten Stickstoffmenge entspricht. Der Schluß, den er aus seinem Experiment zieht, lautet: „Während eines Teiles der Gärung steht Hefewachstum und Zuckerzersetzung in direktem Verhältnis zueinander.“ Schließlich darf man besonders sein Resultat nicht verallgemeinern, daß das Hefegewicht und die Menge Stickstoff in der Ernte bis zum Ende der Gärung sich vermehrt. Denn bei einem Prozentgehalt von nur 10 % Glukose wird eben völlige Vergärung schon erreicht, ehe der gebildete Alkohol das Wachstum hemmt, was nach Hayduck erst bei 5 % Alkohol der Fall ist. Hätte Stern 15 oder 20 % Zucker zur Vergärung gebracht, so würde er am Ende schon den Abfall des Stickstoffgehaltes der Hefe bemerkt haben.

Das Verhalten verschiedenartiger Hefen in bezug auf die Stickstoffausnutzung.

Petit[1]) verglich das Verhalten wachsender Ober- und Unterhefe gegenüber einer kombinierten Stickstoffernährung von Ammoniak als Ammonphosphat und Asparagin. Die nach 12tägiger Gärung nicht verbrauchte Menge Ammoniak bestimmte er durch Destillation mit gebrannter Magnesia. Diese abgezogen von der Gesamtmenge des in der Lösung verbleibenden Stickstoffs sprach er als unverbrauchtes Asparagin an, während es in Wahrheit Asparaginstickstoff plus von der Hefe ausgeschiedener Stickstoff war.

So findet er, daß die Oberhefe 65 % ihres Stickstoffs aus dem Ammoniak und 35 % aus dem Asparagin bezieht, während die Unterhefe 86 % als Ammoniak und nur 14 % als Asparaginstickstoff aufnimmt. In Wahrheit war in beiden Fällen die Menge des assimilierten Asparaginstickstoffs geringer.

Boulanger[2]) fand große Schwankungen in der Hefemenge und deren Stickstoffgehalt bei der Verwendung verschiedener Heferassen auf derselben Würze, die er so vorbereitet hatte, daß der sich bildende Alkohol kein Eiweiß ausfällt, sondern aller der Würze entzogene Stickstoff auf den Hefegehalt zu rechnen ist. So schwankte die gebildete Hefemenge zwischen 2,13 und 3,25 g pro Liter und ihr Stickstoffgehalt zwischen 5,18 und 9 %, bei verschiedenen Hefen, während der Würze wie er sagt zwischen 17,1 und 37,6 % ihres Stickstoffgehaltes entzogen wurden, wie wir sagen, nach Verlauf der Gärung in der Hefe zurückgeblieben war.

Aus beiden Veröffentlichungen sieht man wiederum deutlich, wie wenig man Resultate über die Stickstoffentnahme durch die Hefe aus Lösungen verallgemeinern darf.

Einfluß der Lüftung auf den Stickstoffgehalt gebildeter Hefe.

Boulanger beobachtete weiter, daß bei erleichtertem Luftzutritt in flacher Schicht der Nährlösung die Hefe der Würze mehr Stickstoff entzieht, als bei vermindertem Zutritt oder Ausschluß der Luft.

---

[1]) Petit, Comptes rendus **124**, 93. 1897.

[2]) Boulanger, Annales de l'Institut Pasteur **10**, 597. 1896.

Zu demselben Resultat kommt Hyde[1]) beim Vergleich des Stickstoffgehaltes von drei verschiedenen Versuchen, in denen der erste mit größter Hefemenge gelüftet, der zweite mit mittlerer ohne und der dritte mit kleiner Hefemenge und geringer Lüftung angestellt wurde. Die in der Hefe vorgefundenen Stickstoffmengen machten 23,84 %, bzw. 16 % und 15,82 % des anfangs in der Lösung vorhandenen Stickstoffs aus. Etwas getrübt wird die Klarheit des Resultats durch die verschiedene Aussaatmenge. Bokorny[2]) dagegen beobachtete bei einer Vermehrung des Stickstoffgehaltes der Hefe um das dreifache, bei Peptonernährung, allerdings schon nach zwei Tagen keinen wesentlichen Unterschied in der Stickstoffaufnahme zwischen ausschließlicher Sauerstoffatmung und Gärung.

Im ganzen lassen sie die Resultate jedenfalls doch dahin zusammenfassen, daß Lüftung die Stickstoffaufnahme durch die Hefe begünstigt, wie das als die Folge gesteigerten Wachstums nur natürlich erscheint. Dadurch steigert sich die Gesamtstickstoffmenge der Hefe, während ihr Prozentgehalt an Stickstoff vermindert ist.

Der Einfluß der Temperatur auf den Verbrauch des Stickstoffs durch die Hefe.

Laborde[3]) untersuchte den Stickstoffumsatz verschiedener Moste bei der Gärung mit besonderer Berücksichtigung des Ammoniak-Stickstoffs, von dem 44—224 mg im Liter Most vorgefunden wurde. Die Arbeit berücksichtigt aber nicht den Einfluß der Temperatur auf den Verbrauch einer Stickstoffquelle durch die Hefe, sonderndie Wechselwirkung zwischen dem Verbrauch des Ammoniak- und organisch gebundenen Stickstoffs. Die Hefe nützt unter diesen Bedingungen den Ammoniak-Stickstoff reichlich aus, so daß in manchen Fällen fast die ganze Menge aus dem Most verschwindet. Besonders wird das Ammoniak unter günstigen Lebensbedingungen bei optimaler Wachstumstemperatur aufgenommen. So wird von einer Medok-Hefe der Ammoniak-Stickstoff in höherem Maße in

---

[1]) Hyde, Journ. of the fed. Institute of Brewing **1**, 380. 1895.

[2]) Th. Bokorny, Allgem. Brauer- und Hopfenztg. **1902**, 1677; nach Kochs Jahresbericht **13**, 238.

[3]) Laborde, Ann. de l'Pasteur **12**, 517. 1898.

Anspruch genommen als der organisch gebundene Stickstoff, während bei 30° das Umgekehrte der Fall war. Verschiedene Hefen verhalten sich in bezug auf die Ausnutzung verschieden. Befreit man den Most vom Ammoniak, so wird die Gärung dadurch in einem Falle um 50% verzögert. Die Menge, des sich im Wein vorfindenden organisch gebundenen Stickstoffs wird z. T. durch den aus der Hefe austretenden erhöht. Deshalb ist auch bei höherer Temperatur der Wein etwas reicher an organisch gebundenem Stickstoff als der entsprechende Most. Bei unreiner Gärung ist der Ammoniakgehalt des Weines größer als bei reiner, wie schon Müntz[1]) gezeigt hat. Dies beruht dann erstens auf einer schlechteren Ausnutzung des Ammoniak-Stickstoffs durch die Hefe, andererseits aber auch auf einer Bildung von Ammonik durch gewisse Bakterien des Weines, die besonders bei höherer Temperatur zur Entwicklung kommen.

Theoretisch wichtig ist also das Resultat, daß bei gemischter Stickstoffnahrung der Ammoniak-Stickstoff bei optimaler Temperatur besser, bei höherer Temperatur schlechter als der organisch gebundene Stickstoff ausgenutzt wird.

Der Einfluß kombinierter Stickstoffquellen auf die Gärwirkung und den Stickstoffumsatz.

Die Angaben der Literatur über den Einfluß gemischter Stickstoffquellen auf Gärwirkung und Stickstoffausnutzung sind nicht sehr zahlreich. Vor allem aber sind die Versuche nur innerhalb geringer Konzentrationsgrenzen der Stickstoffgabe angestellt worden, so daß, wie durch meine Versuche gezeigt wird, die Verallgemeinerung der Resultate öfters zu falschen Schlüssen geführt hat. In chronologischer Reihenfolge ordnen sich die Veröffentlichungen folgendermaßen an. Kusserow[2]) stellte zwei Versuchsreihen an. Bei der ersten wurde der Stickstoffgehalt von 500 ccm Würze um 1 g und 2 g Asparagin vermehrt. Bei einer Aussaat von 2,5 g Hefe wurde der Gärverlauf, bei dem sich die Hefe noch etwa auf das 3,5—4fache ihres Gewichtes vermehren konnte, beobachtet und gefunden, daß er durch gesteigerte Stickstoffgabe beschleunigt wird. Dagegen verminderte sich die Hefe-

[1]) Müntz, Kochs Jahresbericht 8, 115. 1897.
[2]) R. Kusserow, Brennereiztg. 14, Nr. 317. 1880 (1897).

ausbeute von 9,6 g ohne Asparagin auf 9,1 g mit 1 g Asparagin und 8,2 g mit 2 g Asparagin. Wurde nun die Triebkraft nach Hayduck, der in den Zuchten erhaltenen Hefe bestimmt, so stellte sich heraus, daß sie mit wachsender Stickstoffgabe abnahm. In der zweiten Versuchsreihe wurde 500 ccm reine Zucker-Nährsalzlösung mit einem Stickstoffzusatz von 1) 7 g Asparagin, 2) 5 g Asparagin + 2 g Pepton, 3) 2 g Asparagin + 4 g Pepton, 4) 7 g Pepton verwandt. Der Hefezuwachs von 2,5 g betrug für 1) 12,1 g, 2) 13,3 g, 3) 13,3 g, 4) 14,8 g. Die Hefeausbeute aus Peptonlösung ist aber um ein geringes größer als die aus Asparaginlösung. Dagegen war der Gärverlauf mit Asparagin ein schnellerer als mit Pepton. Die Triebkraft der Amidhefen ist hoch bei sehr langsamer Angärung, die Peptonhefen gären schnell an, haben aber geringe Triebkraft.

Theoretisch stehen die Angaben über die Triebkraft der ersten Versuchsreihe zu denen Hayducks und denen der zweiten Versuchsreihe im Gegensatz. Eine auf stickstoffreicherer Lösung gezogene Hefe hätte auch mehr Stickstoff enthalten und folglich höhere Triebkraft haben müssen. In der zweiten Versuchsreihe tritt das auch hervor. Denn abgesehen davon, daß allerdings Amidstickstoff mehr zur Anreicherung der Hefe beiträgt, hat Kusserow ja gar nicht gleiche Stickstoffmengen geboten. Das Asparagin enthielt mehr Stickstoff als das Pepton. Die Resultate sind daher schlecht vergleichbar, besonders aber ist der allgemeine Schluß, die Amide geben schnellere Gärungen als Pepton, falsch, da, wie sich später zeigen wird, die Stickstoffkonzentration nicht genügend variiert wurde.

Dasselbe läßt sich über die Verallgemeinerung Langes[1]) in seinem im Anschluß an die Kusserowschen gemachten Versuche sagen, wenn er schreibt: „Eine Gesetzmäßigkeit in der Beschleunigung resp. Verlangsamung der Gärung durch Zusatz der verwendeten Stickstoffmengen wurde nicht beobachtet.“ Bokornys[2]) Angaben über die Gewichtszunahme der Hefe bestätigen die von Kusserow. Nach zweitägigem Stehen bei 30° vermehrte sich die Trockensubstanz eines Gramms Hefe von 0,31 bei Peptonnahrung auf 0,88 g und bei Asparagin nur auf 0,62 g. Der Wert für Ammon-

---

[1]) H. Lange, Kochs Jahresbericht **10**, 108. 1899.

[2]) Th. Bokorný, Kochs Jahresbericht **13**, 238. 1902.

sulfat liegt mit 0,55 g noch niedriger. Auch fand er noch, daß bei ausschließlicher Sauerstoffatmung und bei bloßer intramolekularer Atmung (Gärung), wofür er das Luftdurchleiten im Gegensatz zur in Ruhe befindlichen Wachstumsgelegenheit fälschlicherweise anzusprechen behielt, eine etwa geringere Erhöhung der Trockensubstanz erzielt wurde. Natürlich wird aber weder durch das Luftdurchleiten die Gärung noch das in-Ruhe-stehen-lassen der Lösung die Ausnutzung des Sauerstoffs vermieden. Behrens[1]) fand, daß Peptonzuwachs den Verlauf der Gärung des Mostes außerordentlich beschleunigte, aber die Alkoholproduktion im Gegensatz zu früheren Versuchen nicht herabsetzte. Daß letzteres nur in gewissen Grenzen richtig ist, folgt aus den Beobachtungen von Iwanowski[2]). Wenn auch dessen Satz: „je höher die Konzentration von stickstoffhaltiger Substanz (Pepton) ist, desto schwächer ist die Gärung, je höher die Zuckerkonzentration ist, desto stärker geht die Alkoholgärung von statten“ viel zu allgemein ist und nur für Stickstoffgaben von einem Optimum für die Gärwirkung nach oben gelten kann, so geht doch aus seinen Versuchen hervor, daß die Hefe in sehr stickstoffreicher Lösung bei Gegenwart nur geringer Zuckerkonzentration ihren Charakter als Gärungsorganismus in hohem Grade verliert, wogegen ihre Vermehrungsfähigkeit vielmal größer wird. In Lösungen, welche etwa 0,5 % Zucker und ungefähr doppelt soviel Pepton enthalten, ist fast keine Gärung mehr zu beobachten.

Einer besonderen Besprechung müssen die Resultate von Hess[3]) gewürdigt werden, da sie von allen anzuführenden zu denen der folgenden Arbeit in nächster Beziehung stehen. Er untersuchte unter anderem die Gärwirkung der Hefen Saaz, Frohberg und Logos bei verschiedener Stickstoffernährung. Dazu verwandte er Hefewasser, Pepton und Asparagin und stellte den Stickstoffgehalt der Nährlösungen so ein, daß er für alle drei Quellen derselbe und zwar etwa 0,08 g pro Liter wurde. Er untersuchte aber nur eine Stickstoffkonzentration. Dabei fand er, daß die Hefe Logos die beiden andern an Gärwirkung übertraf und zwar sowohl bei Asparagin wie bei Hefewasserernährung. Eine Ausnahme soll darin das Pepton machen, bei dem Frohberg- bei

[1]) Behrens, Kochs Jahresbericht **14**, 249. 1903.
[2]) Iwanowski, Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **10**, 151, 1903.
[3]) Fr. Hess, Dissertation. Erlangen **1897**.

genannter Stickstoffkonzentration zu schnellerem Gärverlauf kommt als Logos-Hefe. Dies wird jedoch durch meine zahlreichen Vergärungskurven nicht bestätigt. Nach ihnen gärt bei 0,008% Stickstoff Logos-Hefe mit Asparaginernährung auch schneller als Frohberg-Hefe. Die Unterschiede zwischen der Hessschen und meiner Versuchsanstellung, 10% Zucker gegen 15% und Aussaat von 30 Zellen pro ccm Lösung gegen minimale Aussaat, können nach meinem Dafürhalten die divergierende Beobachtung nicht erklären. Ich glaube, daß Hess bei einer Stickstoffkonzentration zu sehr von Zufälligkeiten abhängig war, wie sie sich bei solchen Gärverlaufprüfungen auch in meinen Versuchen häufig zeigten. Sicher geht aber aus den Untersuchungen von Hess noch hervor, daß Hefewasser besser als Asparagin und Pepton bei der angegebenen Stichstoffkonzentration wirkt. Da diese nun nach meinem Befund die optimale für Asparagin ist, so folgt daraus, daß sich mit Hefewasser ein noch höherer ökonomischer Koeffizient d. h. eine höhere Gärwirkung im Vergleich zur Stickstoffgabe, erzielen läßt als mit Asparagin.

Weiter fand Hess die Vermehrungsenergie der Hefe Logos nach vier und nach achtundzwanzig Tagen bei allen Stickstoffquellen, die er prüfte, größer als bei Hefe Frohberg und Saaz. Die Resultate lassen sich aber zu meinen, die die Zahl der am Ende der Gärung gebildeten Hefezellen angeben werden, nicht in Beziehung setzen.

Hier ist dann noch eine Arbeit von J. J. van Hest[1]) über die „Quantitative Bestimmung der Hefeernte aus der Stickstoffaufnahme und die Beziehungen zwischen Alkoholbildung und Stickstoffaufnahme“ zu berücksichtigen. Die Resultate beziehen sich nur auf die Vergärung von Würze, die in sechs Tagen beendet war. Die Durchschnittsresultate von zwölf Versuchen ergaben für den insgesamt aufgenommen Stickstoff bis zum dritten Tage 76%, zwischen dem dritten und sechsten Tage 24%. Von 100 Teilen Alkohol wurden bis zum dritten Tage 40%, vom dritten bis zum sechsten Tage 60% gebildet. Die Schlußfolgerung ist, daß bei einer normal verlaufenden Gärung die Alkoholbildung umgekehrt proportional der Stickstoffaufnahme ist. Als weitere Resultate soll aus den Versuchen hervorgehen, daß man imstande

[1]) Wochenschr. f. Brauerei **21**, 1. 1904.

ist, durch Stickstoffbestimmung der Würze die Hefeernte zu bestimmen, ferner die Hefeaussaatmenge festzustellen und das Verhältnis zwischen gebildetem Alkohol und aufgenommenem Stickstoff zu finden. In der Tat besteht in der angegebenen Tabelle eine Proportionalität zwischen der Stickstoffaufnahme und der Hefeernte. Man wird aber gut tun weitere Resultate mit verschiedenen Würzen abzuwarten. Jedenfalls darf man die Angaben nicht auf andere Nährlösungen übertragen. Die Arbeit gilt nur für Würzen mit schnellem Gärverlauf.

Daß auch die Vergärung von Mosten durch den Stickstoffgehalt stark beeinflußt wird und so in direkter Beziehung steht zur Stickstoffdüngung der Weinberge, berichtet Müller-Thurgau[1]). Im allgemeinen haben die natürlichen Moste aber einen Überfluß an Stickstoffnahrung, weshalb es Müller-Thurgau auch gelang einen Most bei jedesmaliger Entfernung des Trubs und Alkohols unter erneuter Zugabe von Zucker sechs Gärungen durchmachen zu lassen. Wortmann[2]) beobachtete, daß der Moststickstoff nie ganz, sondern höchstens zu 55,78 % und mindestens zu 6,5 % von der Hefe verbraucht wurde. Und zwar gaben die stickstoffärmsten Moste den meisten Stickstoff an die Hefe ab. Wortmann erklärt dies dadurch, daß die stickstoffreichen Moste auch viel Zucker haben und in diesen daher bald bei der Gärung so viel Alkohol entsteht, daß er hindernd auf die Vernehmung und dadurch auf die Stickstoffentnahme aus dem Most wirkt.

Das Verhalten der Eiweißstoffe während der alkoholischen Gärung.

In seiner unter diesem Titel veröffentlichten Arbeit setzt sich Iwanoff[3]) in Gegensatz zu allen früheren Autoren, wenn er schreibt: „Die Eiweißzerspaltung macht sich bei der Gärung nicht bemerklich“. Er kam zu diesem Schluß, nach dem er den nach Stutzer mit Kupferoxyd fällbaren Eiweißstickstoff einer gewogenen Hefemenge vor und nach der Gärung übereinstimmend fand. Dieses Resultat wäre mit den Beobachtungen früherer Autoren sehr schwer in Einklang zu bringen, wenn Iwanoff nicht als Ein-

---

[1]) Nach Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie 4, 105.

[2]) Kochs Jahresbericht 5, 167. 1894.

[3]) Leonid Iwanoff. Zeitschr. für physiol. Chemie. 62, 464. 1904.

schränkung zuließe, daß bei langedauernder Gärung in reinem Zucker ein „Erschöpfen" der Hefe eintritt, das mit einem Stickstoffverlust während der Gärung nichts zu tun hat. Er sagt, in solchen Fällen, wo sich dieses nicht durch das Absterben der Zellen erklären läßt, haben wir es mit einer physiologischen Reaktion, die dem Ruhestadium entspricht und sehr wahrscheinlich durch Veränderung des Enzymgehaltes oder das Entstehen von Stoffen, welche die Gärung hemmen, erklärt werden kann, zu tun.

Die Anschauung Iwanoffs gewinnt dadurch an Wahrscheinlichkeit, daß er eine sich während der Gärung bildende flüchtige Substanz, von allerdings noch ganz undefiniertem Charakter, nachwies, die die Proteolyse der Hefe zu hemmen imstande war.

Theoretisch wichtig an Iwanoffs Versuchen ist, daß der Zusammenhang zwischen Eiweißzerfall und Gärung nur ein loser ist. Gärung kann auch ohne den Zerfall des Hefeeiweiß eintreten, ist ein wichtiger Satz, der sich aus seinen Versuchen ableiten läßt.

Damit wird aber an der Tatsache nichts geändert, daß sich der Stickstoffgehalt einer Hefe bei der Gärung vermindert, auch wenn die Gärperiode nicht in die Erschöpfungszeit der Hefe hinein ausgedehnt wurde. Es muß dann der Nichteiweißstickstoff der Zelle, der immer vorhanden ist, seinen Weg aus der Zelle nehmen. Auch bezieht sich die Angabe Iwanoffs nur auf die Vergärung reiner Zuckerlösungen. Wird der Hefe während der Gärung assimilierbarer Stickstoff geboten, so wird sie dadurch zum Stickstoffumsatz angeregt, auch wenn sie durch große Aussaat am Wachstum gehindert wird. Dies werden meine Versuche zeigen. Man muß daher den Iwanoffschen Satz, die Eiweißspaltung macht sich während der Gärung nicht bemerkbar, dadurch einschränken, daß man hinzufügt, in reiner Zuckerlösung in Abwesenheit verwendbarer Stickstoffnahrung. Das theoretische Interesse des Satzes bleibt dabei ungeändert, die Behauptung, keine Gärung ohne Eiweißzerfall, wird zunichte, aber für die praktischen Fälle kommt, da sie immer in Gegenwart von Stickstoffnahrung unternommen werden, nach wie vor ein Stickstoffumsatz während der Gärung in Betracht.

Interessant ist es, hier die Versuche von Godlewski[1]) über den Eiweißabbau bei der intramolekularen Atmung von Samen

[1]) F. Godlewski. Bulletin international de l'académie des scienes de Cracovie. 1904, 115.

zum Vergleich heranzuziehen. Godlewski gelang es, die intramolekulare Atmung von Lupinensamen, die arm an Kohlenhydraten und reich an Eiweißstoffen sind, durch Zusatz von vergärbarem Zucker zu steigern. Er beobachtete bei seinen unter aseptischen Vorsichtsmaßregeln ausgeführten Versuchen tiefgreifende Zersetzungen eines Teiles der Eiweißsubstanzen der Lupinensamen. Dabei trat der Stickstoff der zersetzten Eiweißstoffe vorwiegend in Form von Aminosäuren auf. Auch dadurch wird also ein neuer Zusammenhang zwischen den Vorgängen bei der intramolekularen Atmung und denen bei der Hefegärung hergestellt.

Eigene Versuche.

I. Abschnitt.

Die Gärwirkung verschiedener Hefe bei verschiedener Stickstoffquelle und Stickstoffkonzentration.

Bei der Vergärung von Zuckerlösungen mit verschiedenen Stickstoffquellen und in Gegenwart von Nährsalzen zeigte sich, daß nicht nur die Art der Stickstoffquelle sondern auch deren Konzentration von gesetzmäßigem Einfluß auf die Schnelligkeit des Gärverlaufs war. Gewählt wurden für diese Versuche das Pepton als Repräsentant der höheren, das Leucin als Repräsentant der niederen Eiweißzerfallprodukte, dazu das zur Hefeernährung häufig vorteilhaft befundene Asparagin und schwefelsaures Ammoniak als mineralische Stickstoffquelle.

Die beobachtete Gesetzmäßigkeit, die zuerst bei der Vergärung mit Logos-Hefe gefunden wurde, war: 1. für das Pepton ein beschleunigter Gärversuch mit steigender Stickstoffgabe; 2. für das Leucin ein verlangsamter Gärverlauf mit steigender Leucinmenge von einer gewissen Leucinkonzentration mit optimalem Gärverlauf an, von dem aus nach unten natürlich wieder ein Abfall im Gärverlauf zu verzeichnen sein mußte, bis schließlich infolge Mangels an Stickstoff gar keine Gärung mehr zustande kommt; 3. für das Asparagin ein ähnlicher Einfluß wie für das Leucin, doch mit weniger ausgeprägter Wirkung; 4. für das schwefelsaure Ammoniak ein noch weniger starker, dem Leucin und Asparagin analoger, Einfluß bis zu einem Punkte schon recht hoher Stickstoffkonzentration. Diese wurde nur beim schwefelsauren Ammoniak und nicht beim

Leucin oder Asparagin verwandt, so daß hier wohl als Folge der osmotischen Hinderung plötzlich stark ausgeprägter Abfall im Gärverlauf zu verzeichnen war.

Die beobachtete Gesetzmäßigkeit weiter zu verfolgen, schien aus mancherlei Gründen lohnend. Erstens wurde durch den Wechsel in der Wirkung verschiedener Stickstoffkonzentration deutlich gemacht, daß man sich bei der Prüfung verschiedener Stickstoffquellen in ihrer Wirkung auf den Gärverlauf nicht mit ein paar Versuchen und wenigen Konzentrationen zu begnügen hat. Man darf also nicht, wie das so häufig geschieht, einfach aussagen, eine Substanz wirke günstig oder ungünstig auf die Gärung als Stickstoffquelle der Hefe. Leucin wirkt z. B. bei höherer Konzentration ungünstig, bei niederer dagegen günstig. — Weiterhin mußte die Frage entschieden werden, wie sich verschiedene Hefen verhalten, ob etwa ganz andere Einflüsse der Stickstoffkonzentration mit verschiedenen Hefen zutage treten; und schließlich war noch der Versuch zu machen, die Ursache in der Wirkung verschiedener Stickstoffquellen auf den Gärverlauf zu finden. Hier wurde schon eine Frage von ziemlicher Schwierigkeit gestreift. Es sollte eine Relation gefunden werden zwischen der Ernährung der Hefe einerseits und der Wirkung der Hefe als zuckerzersetzendes Mittel anderseits oder, wie Duclaux sich ausdrücken würde, zwischen der vegetativen Hefe und der gärenden Hefe. Daß die Zahl gleichbeschaffener Hefezellen einen Einfluß auf die Schnelligkeit der Gärung hat, daß sie mit steigender Zahl auch steigende Wirkung hat, ist bekannt. Dazu kommt aber auch in unserem Falle ein nicht nur mögliches, sondern sehr wahrscheinliches Schwanken im Stickstoffgehalt der Hefe, mit dem, wie vorher erörtert, ja die Gärkraft zunimmt. Beide Faktoren zusammen mußten aber geprüft werden; nur aus der Kombination beider konnte sich ein Bild von dem Einfluß der Stickstoffnahrung auf die Gärwirkung der Hefe bei minimaler Einsaat ergeben.

Um zuerst der Verallgemeinerung für verschiedene Hefe gerecht zu werden, wurden Pepton- und Leucin-haltige Lösungen, bei denen das klarste Bild des Konzentrations-Einflusses gefunden worden war, außer mit Logos-Hefe noch mit Frohberg-Hefe, die weniger klar verlaufenen Vergärungen verschiedener Konzentrationen von Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak mit Frohberg- und Weinhefe, Typus Oppenheimer Kreuz, vergoren.

Die Gesetzmäßigkeit wurde im selben Sinne wiedergefunden. Daß im einzelnen eine verschiedene Wirkung verschiedener Hefe auf die genannten Stickstoffquellen zutage trat, war von vornherein zu erwarten. Daraus ergeben sich dann wieder gewisse Beobachtungen, über die Gärwirkung verschiedener Hefen auf Nährlösungen von verschiedenem Stickstoffgehalt.

Weiterhin wurde der Einfluß von kombinierten Stickstoffquellen auf die Gärwirkung geprüft, wobei sich, wiederum als allgemeine Gesetzmäßigkeit, die Tatsache herausstellte, daß die Kombination verschiedener Stickstoffquellen die Gärwirkung außerordentlich steigert, daß auch Stickstoffquellen, die allein einen langsamen Gärverlauf zur Folge haben, kombiniert mit anderen derselben Wirkung weit günstiger wirken, selbst wenn die Summe des gebotenen Stickstoffs nicht vermehrt worden war. In solchen Fällen war auch der Stickstoffgehalt der Hefe am Ende der Gärung, der ja allein ermittelt werden konnte, ein auffallend übereinstimmender.

Experimenteller Teil.

I. Vergärung von Zuckerlösungen mit verschiedenen Stickstoffquellen und Konzentrationen.

Die Versuche wurden alle mit einer 15 %igen Zuckerlösung angestellt. Als Nährsalze wurden 0,75 K_2HPO_4, 0,1 g $MgSO_4$, NaCl und $FeSO_4$ als Spur pro L. geboten. Die Impfung geschah immer mit derselben Platinöse. Alle Gärflaschen, die zu einer Versuchsreihe gehörten, wurden zu gleicher Zeit sterilisiert, und dieselbe Zeitspanne zur Lüftung stehen gelassen. Die geimpften und mit Gärverschlüssen versehenen Flaschen wurden auf einer Wage, die 0,1 g genau anzeigt, gewogen und am Anfang, während der Angärung und Hauptgärung täglich — mit Ausnahme von Sonntag, — bei der langsam verlaufenden Endgärung zwei oder ein Mal die Woche gewogen. Denn der Einfluß der Stickstoffnahrung war besonders bedeutsam, so lange noch nicht die Menge des gebildeten Alkohols auf die Wirkung der Zuckerzersetzung, d. h. die vom Alkohol wenig gehinderte Wirkung des Gärenzyms, von bedeutendem Einfluß war. Alle Gärflaschen wurden im gut regulierten Brutzimmer auf derselben Höhe bei 23° gehalten.

Das Volumen der vergorenen Lösungen war immer 250 ccm, wodurch genügende Genauigkeit sowohl wie Handlichkeit garantiert wurde. Doch wurden die Resultate der Klarheit wegen auf ein Liter Nährlösung umgerechnet.

Die Konzentration der verschiedenen Stickstoffquellen wurde so eingerichtet, daß nicht die Mengen der Stickstoffquellen, sondern ihr Stickstoffgehalt sich entsprachen. So kommt z. B. auf 3 g Leucin pro 250 ccm Lösung 1,122 g des Pepton, mit einem durch Analyse ermittelten Stickstoffgehalt von 14,2%, 1,718 g Asparagin + H_2O und 1,513 g. Schwefelsaures Ammoniak, alle mit 0,321 g Stickstoff. Die Konzentrationssteigerung oder Verminderung war in allen Fällen eine sich verdoppelnde.

Die folgenden Tabellen (Seite 163 bis 184) enthalten die Resultate.

A. steht für Logos-Hefe.

Pepton-Logos-Hefe A 1. Leucin-Logos-Hefe A. 2. Asparagin-Logos-Hefe A 3. $(NH_4)2SO_4$ Logos-Hefe A. 4. Leucin aus Melasse-Rückständen A. 5.

B. steht für Frohberg-Hefe.

Pepton-Frohberg-Hefe B. 1. Leucin-Frohberg-Hefe B. 2. Asparagin-Frohberg-Hefe B. 3. $(NH_4)2SO_4$ Frohberg-Hefe B. 4.

C. steht für Weinhefe.

Asparagin-Weinhefe. C. 3. $(NH_4)2SO_4$ Weinhefe. C. 4.

Um die Resultate übersichtlich zu machen, sind sie dann in Koordinatensysteme eingetragen, die mit denselben Merkmalen bezeichnet sind. Besonders bei Betrachtung der so erhaltenen Kurven treten die Gesetzmäßigkeiten klarer hervor.

1. Beim Pepton zeigt sich ein ganz regelmäßiger Abfall in der Schnelligkeit des Gärverlaufes mit abnehmender Stickstoffkonzentration. Die Schnelligkeit der Vergärung einer 15%igen Zuckerlösung nahm bis zu einer Stickstoffgabe von 10,27 g pro Liter zu, bei der Logos-Hefe schon nach sechs Tagen Vergärung erreicht hatte. Bei 5,14 g Stickstoff pro Liter braucht Logos-Hefe schon neun Tage und Frohberg-Hefe 21 Tage.

Ganz ausgeprägt ist die durch Logos-Hefe im Vergleich zu Frohberg-Hefe entfaltete größere Gärungsenergie bei allen geprüften Stickstoffkonzentrationen.

(Fortsetzung Seite 185.)

A. 1. **Pepton.** **Logos-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g Pepton per l	71,80	35,90	17,95	8,975	4,488	2,244	1,122	0,561
g Stickstoff per l	10,27	5,14	2,568	1,284	0,642	0,321	0,161	0,0803
Anzahl der Tage 1								
2	0,0							
3	.	0,4						
4	43,6	3,2	0,4					
5	56,8	32,0						
6	65,2	45,6	0,4	.	.	.	.	1,2
7	.	.	.	8,0	2,0	1,2	1,2	
8	.	63,2	20,0	18,8	4,8	7,2	3,2	5,2
9	.	65,2	31,6	28,8	16,4	13,6	6,8	5,6
10	.		42,8	35,2	22,4	18,8	9,2	7,6
11	.	.	50,8	.	.	.	.	9,2
12	.	.	57,2	46,0	31,6	27,2	15,2	11,2
13	.	.	60,4	51,2	37,2	32,0	18,0	14,0
14	.	.	.	54,2	41,6	35,6	20,8	
15	.	.	62,4	.	.	46,0	.	18,0
16	.	.	63,6	61,6	50,8	49,2	26,8	20,4
17	.	.	63,6	63,2	54,8	.	29,6	22,0
18	.	.	63,6	.	.	56,8	.	23,6
19	.	.	64,0	65,2	61,2	.	34,8	26,0
20	.	.	.	.	.	58,0		
21	.	.	.	66,0	63,6	.	40,8	
22	.	.	.	.	.	63,6	.	32,0
23	.	.	.	66,4	64,0	64,0	46,4	32,8
24	.	.	.	.	64,4	.	.	34,0
25	.	.	.	.	.	.	.	35,6
26	.	.	.	.	.	64,4	.	36,8
27	.	.	.	66,8	64,4	.	51,6	38,0
28	.	.	.	.	.	64,4		
29	.	.	.	69,2	64,4	64,8	53,2	42,0
30	.	.	.	.	.	.	54,0	42,4
31	.	.	.	.	.	.	55,6	46,4
32	.	.	.	.	.	.	.	46,8
33	.	.	.	69,2	64,4	.	58,8	49,6
34	.	.	.	.	.	.	.	50,8
35	.	.	.	.	.	.	61,6	52,0
36	.	.	.	.	64,4	.	.	52,8
37	.	.	.	.	.	.	.	54,0
38	.	.	.	69,2	.	.	63,2	55,2
39	.	.	.	.	.	.	.	56,0
40	.	.	.	.	.	.	.	57,2
41	.	.	.	.	.	.	.	58,4
42	.	.	.	.	.	.	.	60,0
43	.	.	.	.	.	.	66,8	61,2
44	.	.	.	.	.	.	.	62,4
45	.	.	.	.	.	.	.	62,8
46	.	.	.	.	.	.	.	63,6
47	.	.	.	.	.	.	.	64,4

B. 1. **Pepton.** **Frohberg-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g Pepton per l	35,90	17,95	8,975	4,488	2,244	1,122	0,561	0,281
g Stickstoff per l	5,14	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401
Anzahl der Tage 1								
2								
3								
4								
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,4
6	.	0,0						
7	0,0	.	3,6	0,0	4,0	4,4	0,4	0,8
8	0,0	.	7,2	0,0	6,0	6,0	2,8	0,8
9	6,8	6,8	11,2	0,0	8,0	.	.	2,0
10	17,2	14,0	15,2	2,4	10,4	.	6,0	2,4
11	27,2	20,8	19,2	6,0	12,4	14,4	8,0	2,8
12	36,0	27,2	21,4	9,2	14,4	16,4	9,2	3,2
13								
14	47,2	36,4	28,0	15,6	18,0	16,8	11,2	4,4
15	52,0	40,4	30,4	18,4	19,2	17,6	12,0	5,6
16	55,6	41,2	32,8	21,2	20,0	18,4	13,2	6,0
17	58,4	45,6	34,4	24,4	21,2	19,6	14,0	7,2
18	61,2	52,0	36,8	26,0	22,4	20,4	15,2	7,2
19	.	54,4	38,8	27,6	22,4	21,2	15,6	7,2
20	64,0							
21	66,8	60,0	42,0	31,6	24,4	22,4	17,2	8,4
22	.	61,6	43,2	.	.	22,4	17,2	
23	.	63,2	44,4	32,0	24,4	22,8	18,4	8,8
24	.	65,2	46,0	.	.	24,0	19,6	
25	.	66,0	47,2	33,2	.	24,0	20,0	
26	.	66,0	48,0	.	25,2	24,0	20,0	9,6
27	.	.	.	34,0				
28	.	67,6	50,8	.	25,2	25,2	21,6	10,4
29	.	.	.	34,8				
30	.	67,6	50,8	.	25,6	25,2	21,6	10,8
31	.	.	.	34,8	.	25,2		
32	.	.	.	.	25,6	.	.	11,6
33	.	67,6	53,6	.	.	.	22,0	
34								
35	.	.	54,8	.	.	25,2	22,0	
36	.	.	.	35,6				
37	.	.	54,8	.	26,4	25,2	22,4	13,2
38								
39	.	.	56,4	35,6	.	25,6	22,4	
40	.	.	.	.	26,8	.	.	13,6
41								
42	.	.	.	35,6				
43	.	.	.	.	26,8	.	.	14,0
44	.	.	57,6	.	.	26,4	23,6	
45			.					
46	.	.	.	35,6				
47	.	.	58,4	.	26,8	.	24,0	14,0
48	.	.	.	.	.	26,8		
49	.	.	.	35,6				
50	.	.	58,4	.	28,0	26,8	24,0	14,4

g Pepton per l	35,90	17,95	8,975	4,488	2,244	1,122	0,561	0,281
g Stickstoff per l	5,14	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401
Anzahl der Tage								
51								
52	.	.	.	35,6	.	.	.	14,4
53	.	.	60,4	.	28,8	26,8	24,0	
54								
55								
56	.	.	.	36,8	.	.	.	16,0
57	.	.	60,4	.	30,8	27,6	24,8	
58								
59	.	.	.	37,6	.	.	.	17,2
60	.	.	60,4	.	32,0	27,6	24,8	
61								
62								
63								
64	.	.	62,4	38,4	.	28,8	26,8	18,0
65	.	.	.	.	32,8			
66								
67	.	.	.	.	.	29,6	28,0	
68	.	.	.	38,8	.	.	.	18,8
69	.	.	.	.	35,6			
70								
71	.	.	.	39,2	.	.	.	18,8
72	.	.	.	.	36,0	29,6	28,0	
73								
74	.	.	.	.	.	.	.	18,8
75	.	.	.	.	36,0			
76	.	.	.	.	.	29,6	28,8	
77								
78	.	.	.	40,8	.	.	.	20,4
79	.	.	.	.	38,0	32,8	30,0	
80								
81	.	.	.	41,2	.	.	.	21,2
82	.	.	.	.	38,8	32,8	30,0	
83								
84								
85								
86	.	.	.	.	.	33,6	31,6	
87	.	.	.	42,4	.	.	.	22,0
88	.	.	.	.	40,0			
89	.	.	.	.	.	34,8	32,4	
90								
91								
92								
93								
94								
95	.	.	.	.	.	35,6	33,6	22,8
96	.	.	.	43,2	41,6			
97								
98								
99								
100								
101								
102	.	.	.	.	.	.	.	23,6
103	.	.	.	44,8	43,6	40,8	34,8	

g Pepton per l	35,90	17,95	8,975	4,488	2,244	1,122	0,561	0,281
g Stickstoff per l	5,14	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401
Anzahl der Tage 104								
105								
106								
107								
108	.	.	.	.	.	.	.	24,4
109	.	.	.	46,4	45,2	.	.	
110	.	.	.	.	.	42,4	36,4	
111								
112								
113								
114								
115	.	.	.	.	.	.	.	25,2
116	.	.	.	47,6	47,6	43,2	38,4	

A. 2. **Synthetisches Leucin.** **Logos-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g Leucin per l	12	6	3	1,5	0,75	0,375	0,188
g Stickstoff per l	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201
Anzahl der Tage 1							
2							
3	0,4	0,0	0,4	0,0			
4	0,4	0,4	0,4	0,0	.	0,0	0,8
5	.	0,4	0,4	0,0	.	0,8	1,2
6	.	.	.	.	3,6	2,8	2,8
7							
8	.	.	.	.	10,4	6,0	5,2
9	0,4	0,8	1,2	6,0	15,2	7,2	5,6
10	.	.	.	.	20,0	7,6	6,4
11	0,8	2,0	2,0	8,4	23,6	8,8	7,2
12	1,4	3,2	3,2	10,4	28,8	10,0	8,0
13	2,4	4,8	5,2	13,2	32,8	12,0	9,2
14	.						
15	6,4	12,8	10,8	21,2	40,4	16,0	11,6
16	8,0		13,2	26,0	44,4	16,0	11,6
17	10,4	15,6	16,0	29,2	47,2	20,0	15,2
18	13,6	18,8	19,2	33,6	50,0	21,6	16,0
19	16,0	22,0	22,0	37,2	52,8	23,2	16,8
20	18,0	24,4	23,6	40,4	55,2	24,4	17,6
21	.	.	.	.	.	25,6	19,2
22	23,2	30,4	28,8	46,8	59,6	27,2	19,2
23	26,4	34,4	30,8	50,0	60,0	28,8	19,6
24	28,8	37,6	34,8	53,2	60,8	29,6	20,0
25	32,0	39,6	37,2	56,0	61,6	30,4	20,4
26	35,2	43,2	40,0	59,6	62,4	32,4	21,2
27	38,0	46,0	42,8	61,6	63,2	33,6	22,0
28							
29	4,32	51,6	48,0	64,4	64,4	35,6	23,2
30	45,6	54,4	50,0	66,4	.	36,8	23,2
31	48,0	56,4	52,8	66,4	.	38,4	24,4
32	50,0	58,4	54,4	66,4	.	39,2	24,8

g Leucin per l	12	6	3	1,5	0,75	0,375	0,188
g Stickstoff per l	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201
Anzahl der Tage 33	52,4	60,0	56,4	66,4	.	40,8	25,2
34	54,4	61,2	58,8	.	.	41,6	25,6
35							
36	56,8	64,4	61,6	.	.	43,6	26,4
37	59,2	64,4	62,4	.	.	44,8	27,2
38	60,4	.	.	.	.	46,0	28,0
39	61,6	.	.	.	.	47,6	28,8
40	62,4	.	.	.	.	48,6	29,2
41	.	.	.	.	.	49,2	29,6
42							
43	.	.	.	.	.	51,2	30,4
44	.	.	.	.	.	51,6	30,8
45	.	.	.	.	.	52,0	31,6
46	.	.	.	.	.	52,8	32,0
47	.	.	.	.	.	54,0	32,8
48	.	.	.	.	.	54,4	32,8
49							
50	.	.	.	.	.	55,6	34,0
51	.	.	.	.	.	56,4	34,0
52	.	.	.	.	.	56,8	34,4
53	.	.	.	.	.	58,4	35,6
54	.	.	.	.	.	58,8	36,4
55	.	.	.	.	.	58,8	36,8
56							
57	.	.	.	.	.	60,8	38,4
58							
59	.	.	.	.	.	60,8	38,4
60							
61							
62	.	.	.	.	.	62,0	39,6
63							
64	.	.	.	.	.	62,8	41,2
65							
66	.	.	.	.	.	63,9	44,0
67							
68	.	.	.	.	.	64,0	44,0
69							
70							
71							
72							
73	.	.	.	.	.	66,0	44,8
74							
75							
76	.	.	.	.	.	66,4	45,2
77							
78	.	.	.	.	.	66,8	
79	.	.	.	.	.	.	46,0
80							
81	.	.	.	.	.	66,8	
82	.	.	.	.	.	.	46,4
83							
84							
85	.	.	.	.	.	67,6	
86	.	.	.	.	.	.	47,2

g Leucin per l	12	6	3	1,5	0,75	0,375	0,188
g Stickstoff per l	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201
Anzahl der Tage 87							
88	.	.	.	.	.	67,6	
89							
90	.	.	.	.	.	.	47,2
91							
92							
93	.	.	.	.	.	69,6	
94	.	.	.	.	.	.	48,0
95							
96	.	.	.	.	.	70,8	
97	.	.	.	.	.	.	51,2
98							
99							
100							
101	.	.	.	.	.	70,8	
102	.	.	.	.	.	.	52,0
103							
104							
105	.	.	.	.	.	71,6	
106	.	.	.	.	.	.	53,2
107							
108							
109	.	.	.	.	.	.	54,0
110							
111	.	.	.	.	.	72,0	
112	.	.	.	.	.	.	54,0
113							
114							
115	.	.	.	.	.	73,3	
116	.	.	.	.	.	.	55,2
117							
118							
119	.	.	.	.	.	.	56,0
120							
121	.	.	.	.	.	73,3	
122							
123							
124							
125	.	.	.	.	.	.	57,2

B. 2. **Leucin.** **Frohberg-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g Leucin per l	12,0	6,0	3,0	1,5	0,75	0,385	0,188	0,094
g Stickstoff per l	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100
Anzahl der Tage 1								
2								
3								
4	0,0	.	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
5	0,0	.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

g Leucin per l	12,0	6,0	3,0	1,5	0,75	0,385	0,188	0,094
g Stickstoff per l	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100
Anzahl der Tage 6	0,0	.	0,0	0,0	.	0,0	0,0	0,4
7								
8	0,0	.	1,2	1,2	0,0	2,8	1,6	0,8
9	0,4	.	1,6	2,0	0,4	3,6	1,6	0,8
10	1,2	.	3,2	3,6	2,0	5,6	2,4	1,6
11	1,2	.	3,6	5,2	4,0	6,8	2,4	2,0
12	2,0	.	4,4	5,6	6,0	8,0	2,8	2,4
13	2,4	.	4,8	6,8	.	9,2	3,2	2,8
14	.	.	.	.	8,8			
15	4,0	.	6,4	8,8	10,4	12,0	4,4	3,6
16	4,0	.	7,6	9,6	11,2	12,8	4,4	4,0
17	4,8	.	8,0	10,4	12,8	13,6	4,8	4,4
18	5,2	.	9,2	11,6	13,6	14,8	5,2	4,8
19	6,0	.	10,0	12,0	14,4	16,0	6,4	5,2
20	6,4	.	10,8	13,2	.	17,2	6,8	6,0
21	.	.	.	.	16,0			
22	7,6	.	11,6	14,4	16,8	18,0	7,2	6,4
23	.	.	12,0	.	17,6	18,8	7,2	6,4
24	7,6	.	12,8	14,8	18,4	19,2	7,2	6,4
25	8,0	.	13,6	15,2	19,2	20,0	8,0	6,8
26	8,8	.	14,0	.	19,2	20,8	8,0	6,8
27	8,8	.	14,4	16,4	.	21,2	8,4	7,2
28	.	.	.	.	20,8			
29	8,8	.	15,6	16,8	.	22,8	9,2	7,6
30	9,2	.	16,0	17,2	21,2	23,6	9,6	7,6
31	9,2	.	16,8	17,6	.	24,0	9,6	8,0
32	10,4	.	18,0	18,8	.	25,6	10,8	9,2
33	10,4	.	18,0	18,8	22,4	26,0	10,8	9,2
34	10,4	.	18,4	19,2	.	26,4	10,8	9,2
35	.	.	.	.	23,2			
36	11,2	.	20,4	19,2	.	28,4	12,4	10,4
37	.	.	.	.	24,0			
38	11,2	.	20,4	21,2	.	30,0	12,4	11,2
39	.	.	.	.	24,4			
40								
41	11,2	.	21,2	22,4	.	30,0	12,4	11,2
42								
43	11,2	.	22,8	23,2	.	30,0	13,2	11,2
44	.	.	.	.	25,2			
45	11,6	.	23,2	24,8	.	30,4	13,2	11,2
46								
47	11,6	.	24,0	25,6	25,6	30,8	13,6	11,6
48								
49								
50	.	.	.	.	25,6			
51								
52	12,4	.	26,0	27,6	.	32,4	14,8	12,4
53	.	.	.	.	25,6			
54								
55	12,4	.	26,8	28,0	.	32,4	14,8	12,4
56								
57	.	.	.	.	26,0	.	14,8	
58	12,8	.	27,6	29,2	.	32,4	.	12,4

g Leucin per l	12,0	6,0	3,0	1,5	0,75	0,385	0,188	0,094
g Stickstoff per l	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100
Anzahl der Tage								
59								
60	.	.	.	.	26,8	.	15,2	
61	12,8	.	28,4	30,0	.	32,4	.	12,4
62								
63								
64	.	.	.	.	27,6	.	15,6	12,4
65	13,2	.	29,6	32,0	.	33,2		
66								
67	.	.	.	.	.	.	15,6	13,2
68	14,0	.	30,8	32,4	.	33,6		
69								
70								
71	.	.	.	.	.	.	17,6	13,6
72	16,0	.	32,0	36,0	29,6	35,6		
73								
74	.	.	.	.	.	.	17,6	14,4
75	18,0	.	34,2	36,4	.	36,0		
76	.	.	.	.	30,8			
77								
78								
79	.	.	.	.	31,6	.	18,8	14,4
80	18,0	.	36,0	38,0	.	36,8		
81								
82	.	.	.	.	32,4			
83	.	.	.	.	.	.	19,6	14,4
84	19,2	.	39,2	40,0	.	37,2		
85								
86	.	.	.	.	35,6	.	19,6	14,4
87	20,0	.	40,0	40,8	.	37,6		
88								
89	.	.	.	.	.	.	19,6	14,4
90	20,0	.	40,8	40,8	36,8	37,6		
91								
92								
93	.	.	.	.	.	.	20,0	14,4
94	22,0	.	43,6	42,0	.	38,8		
95								
96	.	.	.	.	38,8	.	20,4	14,4
97	22,8	.	44,8	42,8	.	39,6		
98								
99								
100								
101								
102	.	.	.	.	.	.	20,8	14,4
103	24,0	.	47,2	43,6	41,2	40,0		
104								
105								
106								
107								
108								
109	.	.	.	.	.	.	21,2	14,4
110	25,6	.	47,2	44,4	42,4	41,2		
111								

g Leucin per l	12,0	6,0	3,0	1,5	0,75	0,385	0,188	0,094
g Stickstoff per l	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100
Anzahl der Tage 112								
113								
114								
115								
116	.	.	.	.	44,0	.	24,0	14,4
117	26,8	.	48,0	44,8	.	42,0		
118								
119								
120								
121								
122	.	.	.	.	.	.	24,8	14,4
123	28,8	.	48,8	45,2	45,6	42,8		

A. 3. **Asparagin.** **Logos-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g Asparagin + H_2O per l	13,744		6,872	3,436	1,718	0,859	0,429
g Stickstoff per l	2,568		1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803
Millionen-Hefezellen per ccm	16,0	20,5	21,5	42,8	52,4	40,2	24,4
Anzahl der Tage 1							
2							
3							
4	.	0,0					
5	.	0,0					
6	1,2	4,4	.	.	.	.	.
7							
8	8,0	13,2	0,0	2,8	0,8	0,4	10,0
9	13,2	15,2	0,0	2,8	1,6	3,6	
10	23,6	17,6	0,8	4,4	6,4	8,0	16,0
11	28,8	20,8	.	.	.	.	28,0
12	36,4	23,2	4,0	11,6	14,0	16,4	32,0
13	41,2	26,8	.	15,6	18,0	22,8	36,8
14	.	.	.	19,6	21,2	27,6	
15	54,0	34,4	.	.	.	.	46,8
16	55,2	36,8	.	26,8	30,4	37,2	52,0
17	59,2	42,4	18,4	.	33,2	42,8	54,8
18	60,8	45,6	.	.	.	.	57,6
19	.	49,2	24,0	38,8	44,0	51,2	60,8
20	.	52,0	.	.	.	.	62,4
21	.	54,0	30,4	46,0	51,2	58,4	
22	.	56,4	.	.	.	.	64,4
23	.	58,8	38,0	53,6	58,0	61,2	64,4
24	.	62,0	40,8	.	.	62,0	64,4
25	.	63,2	.	.	.	.	64,8
26	.	66,0	.	.	.	.	64,8
27	.	68,0	44,8	59,2	62,4		
28							
29	.	70,4	46,4	62,8	62,4		
30							

g Asparagin per l	13,744		6,872	3,436	1,718	0,859	0,429
g Stickstoff + CO_2 per l	2,568		1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803
Millionen-Hefezellen per ccm	16,0	20,5	21,5	42,8	52,4	40,2	24,4
Anzahl der Tage 31	.	.	48,8				
32							
33	.	.	54,8	63,6	64,0		
34							
35	.	.	58,8				
36							
37							
38	.	.	62,0	64,8	64,4		
39							
40							
41	.	.	.	65,2	64,4		
42							
43	.	.	63,2	.	64,8		
44							
45							
46							
47	.	.	63,6				
48							
49							
50							
51							
52	.	.	64,0				

B. 8. **Asparagin.** **Frohberg-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g Asparagin + H_2O per l	13,744	6,872	3,426	1,718	0,859	0,429	0,214	0,107
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201
Anzahl der Tage 1								
2								
3								
4	.	0,4	.	.	.	.	2,4	0,4
5	0,4	2,0	1,6	0,0	.	0,8	4,8	0,8
6	0,4	2,0	2,0	0,0	.	2,8	6,4	1,6
7	0,8	2,0	2,4	0,0	.	4,4	9,2	2,4
8	1,6	2,8	4,0	0,4	.	6,4	13,2	3,6
9	2,8	4,4	6,4	0,8	.	8,0	13,2	4,0
10	4,4	5,2	8,4	1,2	.	10,4	14,0	5,2
11	6,0	7,2	10,0	2,4	.	12,4	16,8	6,8
12	7,2	8,8	12,4	3,2	.	13,2	.	7,6
13	.	.	.	.	.	.	20,0	
14	10,0	11,6	15,6	5,2	.	18,4	21,4	9,2
15	10,8	12,8	16,4	6,4	.	20,0	23,6	10,0
16	12,8	14,8	19,2	7,6	.	22,0	25,2	11,2
17	14,0	16,0	20,4	8,8	.	23,6	26,4	12,0
18	15,2	17,2	22,0	9,6	.	24,8	27,6	12,8
19	16,4	18,4	23,2	10,0	.	26,0	.	13,6
20	.	.	.	.	.	.	30,4	.

g Asparagin + H_2O per l	13,744	6,872	3,426	1,718	0,859	0,429	0,214	0,107
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201
Anzahl der Tage 21	18,8	20,8	24,8	12,0	.	28,4	31,2	15,2
22	20,0	21,6	25,6	13,2	.	29,2	32,0	15,6
23	20,4	22,8	26,0	13,2	.	29,6	33,2	16,4
24	21,6	24,0	26,4	14,4	.	30,8	34,0	17,2
25	22,8	25,2	28,4	14,8	.	31,6	34,4	18,0
26	24,4	26,4	29,6	17,6	.	32,8	.	18,4
27	.	.	.	.	.	.	35,2	
28	25,6	27,2	30,8	16,4	.	34,0	35,6	19,2
29	26,4	28,0	31,2	16,8	.	34,4	36,0	19,6
30	26,8	28,4	31,6	16,8	.	34,4	36,4	19,6
31	27,6	29,2	32,4	17,2	.	35,2	37,2	20,0
32	28,8	30,4	33,2	18,0	.	36,0	38,0	20,8
33	29,2	30,4	34,0	18,4	.	36,0	.	20,8
34	.	.	.	.	.	.	38,4	
35	30,4	31,6	34,8	19,2	.	36,8	38,8	21,6
36	31,2	32,0	35,2	19,6	.	37,6	38,8	21,6
37	31,6	32,4	36,4	20,0	.	38,4	40,0	22,0
38	32,8	33,6	37,6	21,2	.	39,6	40,4	23,2
39	33,2	33,6	37,6	21,6	.	.	40,4	23,2
40	33,6	34,0	38,0	22,0	.	40,0	.	23,2
41	.	.	.	.	.	.	42,0	
42	35,6	36,0	39,6	22,8	.	41,6	42,0	24,8
43								
44	35,6	36,0	39,6	22,8	.	41,6	.	24,8
45								
46	.	.	.	.	.	.	42,4	
47	37,6	36,4	40,8	24,0	.	42,8	.	24,8
48	.	.	.	.	.	.	43,2	
49	38,0	37,2	41,2	24,4	.	42,8	.	26,0
50	.	.	.	.	.	.	44,0	
51	39,2	38,0	42,0	25,2	.	43,6	.	26,4
52	.	.	.	.	.	.	44,0	
53	39,2	38,4	42,8	25,2	.	44,4	.	26,8
54								
55								
56								
57	.	.	.	.	.	.	45,6	
58	41,2	39,6	43,2	26,0	.	46,0	.	28,0
59								
60	.	.	.	.	.	.	46,0	
61	41,2	39,6	44,0	26,0	.	46,0	.	28,4
62								
63	.	.	.	.	.	.	46,0	
64	41,2	39,6	44,4	26,0	.	46,4	.	28,4
65								
66	.	.	.	.	.	.	47,2	
67	42,0	40,4	45,2	26,4	.	47,2	.	28,4
68								
69								
70	.	.	.	.	.	.	48,0	
71	42,0	40,8	45,6	27,2	.	47,6	.	28,8
72								
73	.	.	.	.	.	.	48,8	

g Asparagin + H_2O per l	13,744	6,872	3,426	1,718	0,859	0,429	0,214	0,107
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201
Anzahl der Tage 74	42,8	41,2	46,0	27,2	.	48,4	.	28,8
75								
76								
77	.	.	.	.	.	.	50,0	30,8
78	44,8	43,2	47,2	28,4	.	50,8		
79								
80	.	.	.	.	.	.	51,6	32,0
81	44,8	43,6	49,2	28,4	.	52,4		
82								
83								
84	.	.	.	.	.	.	53,2	32,8
85	.	44,4	50,0	28,4	.	52,4		
86	45,6							
87								
88	.	.	.	.	.	.	54,0	33,6
89	.	45,2	50,4	29,2				
90	46,0							
91	.	.	.	.	.	.	54,8	
92	.	45,2	52,0	29,2	.	54,4	.	34,4
93	46,0							
94	.	.	.	.	.	.	54,8	
95	.	46,0	52,0	29,2	.	54,4	.	34,4
96	46,0							
97								
98	.	.	.	.	.	.	56,4	
99	.	47,2	55,2	29,6	.	56,4	.	36,8
100	48,8							
101	.	.	.	.	.	.	60,0	
102	.	51,2	56,0	29,6	.	56,8	.	37,6
103	50,0							
104								
105								
106								
107	.	.	.	.	.	.	61,2	
108	.	52,4	57,3	30,0	.	57,6	.	38,4
109	51,6							
110								
111								
112								
113								
114	.	54,0	58,4	.	.	.	62,4	
115	.	.	.	.	.	.	.	39,6
116	54,0	.	.	30,8	.	59,2		
117								
118								
119								
120								
121	.	.	.	.	.	.	63,2	
122	.	55,2	.	.	.	.	.	40,4
123	54,0							
124	.	.	59,6					
125	.	.	.	38,8	.	63,2		
126	.	.	.	.	.	.	64,0	

C. 3. **Asparagin.** **Wein-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g Asparagin + H_2O per l	13,744	6,872	3,426	1,718	0,859	0,429	0,214	0,107
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201
Anzahl der Tage 1								
2								
3								
4	0,0	.	.	.	.	.	2,0	
5	0,0	1,6	0,8	.	0,8	1,2	5,6	0,8
6	0,4	5,2	4,4	.	3,2	3,6	8,8	1,6
7	6,4	8,4	8,4	.	6,8	8,0	12,0	2,4
8	10,4	13,2	12,4	.	10,8	12,0	14,4	2,8
9	14,8	18,0	16,4	.	14,8	17,2	17,6	3,6
10	18,8	21,6	20,4	.	17,6	22,8	19,6	4,0
11	22,8	25,2	24,8	.	21,2	26,8	.	4,8
12	24,0	27,2	28,0	.	24,4	30,8	23,2	5,2
13	.	.	.	.	.	.	24,4	
14	30,4	30,0	32,4	.	29,6	38,8	26,8	6,0
15	32,4	30,8	34,4	.	31,6	42,0	28,4	6,4
16	34,4	32,4	36,8	.	34,4	46,4	30,0	6,8
17	35,2	33,6	37,6	.	36,0	50,4	31,6	7,2
18	36,0	34,8	38,4	.	37,6	53,2	.	8,0
19	36,8	36,4	38,8	.	39,2	56,0	35,2	8,4
20	40,0	.	.	.	.	.	36,4	9,2
21	40,8	38,8	40,8	.	42,4	61,2	36,8	10,0
22	42,4	40,0	42,4	.	42,4	63,6	39,6	10,0
23	44,8	41,2	43,6	.	42,8	64,8	40,8	10,0
24	46,0	43,2	45,2	.	44,0	66,4	42,8	10,4
25	48,0	44,8	47,2	.	44,4	69,6	.	11,6
26	.	46,8	.	.	46,0	.	44,8	
27	49,6	.	48,8	.	.	.	46,0	12,0
28	50,8	48,8	50,0	.	47,2	.	46,8	12,0
29	51,6	50,8	50,8	.	48,0	.	47,6	12,4
30	53,2	51,6	52,4	.	48,4	.	48,8	12,4
31	54,8	52,4	54,0	.	50,0	.	49,6	13,2
32	56,0	55,2	54,8	.	51,2	.	.	13,2
33	.	56,4	.	.	51,6	.	52,0	
34	58,8	.	57,2	.	51,6	.	52,4	14,0
35	59,6	58,8	58,4	.	.	.	53,2	14,4
36	60,8	60,0	59,6	.	55,2	.	54,0	14,8
37	62,8	61,2	61,2	.	55,6	.	55,2	16,0
38	63,6	63,2	62,4	.	58,4	.	55,6	16,4
39	64,4	64,0	62,8	.	59,2	.	.	16,4
40	.	64,8	.	.	60,0	.	58,0	
41	67,2	.	65,6	.	.	.	.	18,0
42	.	68,0	.	.	63,2	.	58,4	
43	68,0	.	67,0	.	.	.	.	18,0
44	.	68,0	.	.	64,4			
45	.	.	.	.	.	.	59,6	
46	70,0	.	68,0	.	.	.	.	18,8
47	.	70,4	.	.	67,2	.	60,4	
48	71,6	.	69,6	.	.	.	.	19,2
49	.	71,2	.	.	69,6	.	61,2	
50	72,4	.	70,0	.	.	.	.	20,0

g Asparagin + H_2O per l	13,744	6,872	3,426	1,718	0,859	0,429	0,214	0,107
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,049	0,0201
Anzahl der Tage 51	.	72,4	.	.	70,8	.	62,0	.
52	72,8	.	70,8	.	.	.	.	21,2
53	.	73,2	.	.	72,0			
54								
55								
56	.	.	.	.	.	.	63,6	
57	.	.	.	.	.	.	.	22,4
58	.	73,2	.	.	73,2			
59	.	.	.	.	.	.	63,6	
60	74,4	.	71,6	.	.	.	.	22,4
61	.	.	.	.	74,0			
62	.	.	.	.	.	.	64,4	
63	74,8	.	72,0	.	.	.	.	23,2
64	.	74,0	.	.	74,0			
65	.	.	.	.	.	.	64,8	
66	75,6	.	72,4	.	.	.	.	23,6
67	.	74,4	.	.	74,0			
68								
69	.	.	.	.	.	.	65,6	
70	75,6	.	72,4	.	.	.	.	23,6
71	.	74,4	.	.	74,4			
72	.	.	.	.	.	.	65,6	
73	75,6	75,4	72,8	.	.	.	.	24,8
74	.	.	.	.	74,4			
75								
76	.	.	.	.	.	.	68,4	
77	.	.	74,0	.	.	.	.	27,6
78	.	76,0	.	.	76,0			
79								
80	.	.	.	.	.	.	.	27,6
81								
82								
83								
84	.	.	.	.	.	.	.	28,8
85								
86								
87								
88	.	.	.	.	.	.	.	29,6
89								
90								
91	.	.	.	.	.	.	.	30,0
92								
93								
94	.	.	.	.	.	.	.	30,0
95								
96								
97								
98	.	.	.	.	.	.	.	31,6
99								
100								
101	.	.	.	.	.	.	.	32,4
102								
103								

g Asparagin + H_2O per l	13,744	6,872	3,426	1,718	0,859	0,429	0,214	0,107
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,049	0,0201
Anzahl der Tage 104								
105								
106								
107	.	.	.	.	.	.	.	33,2
108								
109								
110								
111								
112								
113								
114	.	.	.	.	.	.	.	35,2

A. 4. **Schwefelsaures Ammoniak.** **Logos-Hefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g $(NH_4)2SO_4$ per l	12,104	6,052	3,026	1,513	0,757	0,378	
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	
Millionen-Hefezellen per ccm		17,4	20,0	37,6	16,4	20,0	40,4
Anzahl der Tage 1							
2							
3							
4	0,0	.	.	.	.	0,0	1,6
5	0,0	.	.	.	.	0,4	8,0
6	1,2	.	.	.	.	2,8	16,0
7							
8	5,2	0,0	3,6	0,8	0,0	8,8	29,6
9	5,6	2,8	6,4	2,8	2,0	12,8	31,2
10	7,6	8,3	9,2	5,2	3,6	17,6	36,4
11	8,8	.	.	.	.	20,8	40,8
12	10,4	8,8	13,6	10,8	8,0	25,2	45,2
13	12,4	11,6	16,0	12,0	9,2	30,0	50,0
14	.	18,4	18,4	17,2	13,2		
15	16,8	.	.	.	.	38,0	60,0
16	17,2	23,6	25,2	.	18,4	41,2	61,6
17	21,2	27,6	29,2	28,4	20,4	44,8	67,6
18	22,8	.	.	.	.	47,6	70,4
19	24,8	34,4	36,4	35,6	26,0	50,4	
20	26,4	.	.	.	.	54,0	
21	27,2	39,2	42,8	42,0	27,6		
22	29,2	.	.	.	.	58,8	
23	30,4	44,8	48,4	48,8	36,0	59,6	
24	31,6	48,4	51,2	50,8	.	59,6	
25	33,2	.	.	.	.	62,0	
26	34,8	.	.	.	.	62,4	
27	36,0	52,4	54,0	53,6	42,8	62,8	
28							
29	38,0	54,0	56,0	54,5	44,0	64,4	
30	39,6	54,4	58,0	56,4	46,6		
31	42,0	55,6	59,6	58,8	47,6		

g $(NH_4)_2SO_4$ per l	12,104	6,052	3,026	1,513	0,754	0,378	
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	
Millionen-Hefezellen per ccm		17,4	20,0	37,6	16,4	20,0	40,4
Anzahl der Tage 32	42,8						
33	44,0	59,2	62,0	60,0	51,6		
34	44,8	.	63,6				
35	.	.	.	61,6			
36	47,2	62,0					
37	48,4	63,2	65,2	.	54,8		
38	49,2	.	.	62,8	55,6		
39	50,4						
40	51,2	.	66,0				
41	52,4						
42	.	.	66,4				
43	53,6	64,4	.	64,0	58,5		
44	54,4						
45	54,8						
46	55,6						
47	56,0	.	.	.	64,0		
48	56,8						
49							
50	57,6						
51	57,6						
52	58,0	.	.	.	64,4		
53	59,2						
54	59,2						
55	59,6						
56							
57	60,8						
58							
59	60,8						
60							
61							
62							
63							
64	60,8						
65							
66							
67	61,6						
68							
69	61,6						
70							
71							
72							
73							
74	61,6						
75							
76							
77	61,6						
78							
79	61,6						
80							
81							
82							

g $(NH_4)_2SO_4$ per l	12,104	6,052	3,026	1,513	0,754	0,378	
g Stickstoff per l	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	
Millionen-Hefezellen per ccm		17,4	20,0	37,6	16,4	20,0	40,4
Anzahl der Tage 83	61,6						
84							
85							
86	61,6						
87							
88							
89	61,6						
90							
91							
92							
93	62,4						
94							
95							
96	63,2	bis zum 121. Tage.					

B. 4. Schwefelsaures Ammoniak. Frohberg-Hefe.

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g $(NH_4)_2SO_4$ per l	24,208	12,104	6,052	3,026	1,513	0,757	0,378	0,189	0,095	0,047	0,028
g Stickstoff per l	5,136	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100	0,0050
Anzahl der Tage 1											
2											
3											
4	.	0,0	.	0,4	0,4	0,0	0,0	.	0,4		
5	.	0,0	.	1,6	0,8	0,4	0,4	2,0	0,8		
6	.	0,0	.	2,0	0,8	0,4	1,2	2,4	1,2		
7	.	0,0	.	3,2	1,2	1,2	2,0	3,6	1,6		
8	0,0	0,0	.	4,8	2,0	1,6	3,2	6,0	1,6		
9	.	0,4	.	6,0	2,4	3,2	4,8	7,6	1,6		
10	0,4	0,8	.	7,6	3,2	3,6	6,4	8,0	2,0	.	0,4
11	.	1,2	.	8,4	4,4	4,4	7,6	10,0	3,2		
12	1,2	.	.	.	5,6	5,6	.	11,2	.	.	1,2
13	.	2,0	.	11,2	.	.	9,6	13,2	3,6	.	1,2
14	2,4	2,4	.	12,0	6,8	7,2	10,8	.	4,0		
15	.	3,2	.	13,2	7,6	8,0	12,4	14,8	4,8	.	1,2
16	.	3,6	.	14,8	8,4	9,6	13,6	16,0	4,8	.	1,2
17	.	4,4	.	15,6	8,8	10,4	14,4	15,2	4,8	.	1,6
18	.	4,8	.	16,4	9,2	11,2	15,2	16,4	5,2	.	2,4
19	7,2	.	.	.	10,0	11,6	.	17,2	.	.	2,4
20	.	5,2	.	18,4	.	.	16,8	.	6,0	.	2,4
21	.	6,0	.	19,2	10,8	13,2	17,6	20,8	6,4		
22	8,4	6,0	.	19,6	12,0	14,0	18,4	21,6	6,4	.	2,8
23	.	7,2	.	20,8	12,4	14,4	19,6	22,8	7,6	.	2,8
24	.	7,6	.	21,6	13,6	15,2	.	23,6	7,6		
25	9,6	8,0	.	22,0	14,0	15,6	20,8	24,4	8,0		
26	.	.	.	.	14,8	16,8	.	25,2			
27	.	8,8	.	22,8	.	.	21,6	.	8,0	.	3,2
28	11,2	9,2	.	22,8	14,8	17,2	21,6	26,0	8,4		

g $(NH_4)_2 SO_4$ per l	24,208	12,104	6,052	3,026	1,513	0,757	0,378	0,189	0,095	0,047	0,028
g Stickstoff per l	5,136	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100	0,0050
Anzahl der Tage											
29	.	9,2	.	23,2	15,2	17,2	21,6	26,0	.	.	3,2
30	.	9,6	.	23,2	15,2	17,6	22,4	26,4	8,4		
31	.	10,4	.	24,0	15,6	17,6	22,8	26,8	.	.	4,0
32	13,2	10,8	.	24,0	16,4	18,4	22,8	27,2	9,2		
33	.	.	.	.	16,4	18,4	.	27,6	.	.	4,0
34	.	11,2	.	24,4	.	.	23,6	.	10,0		
35	.	11,6	.	24,8	16,8	18,8	23,6	28,0	10,4		
36	.	11,6	.	24,8	16,8	18,8	24,0	28,0	10,4		
37	.	12,8	.	26,0	16,8	19,2	24,8	28,8	11,6		
38	.	13,2	.	26,0	17,6	20,0	24,8	29,6	11,6	.	4,0
39	17,2	13,2	.	26,0	17,6	20,4	25,2	29,6	11,6		
40	.	.	.	.	18,0	20,4	.	30,0			
41	.	14,8	.	27,6	.	.	26,4	.	12,8	.	4,0
42	20,4	.	.	.	18,8	21,6	.	30,8			
43	.	14,8	.	27,6	.	.	26,4	.	12,8		
44	.	.	.	.	18,8	21,6	.	30,8	.	.	4,0
45											
46	.	14,8	.	27,6	.	.	26,4	.	12,8		
47	21,2	.	.	.	18,8	21,6	.	31,2	.	.	4,0
48	.	15,6	.	27,6	.	.	26,8	.	13,2		
49	.	.	.	.	19,2	21,6	.	31,6			
50	.	16,0	.	28,4	.	.	27,2	.	13,2		
51	23,2	.	.	.	19,2	21,6	.	32,0	.	.	4,8
52	.	.	.	28,4	.	.	27,2	.	13,2		
53	.	16,4	.	.	19,2	22,0	.	32,4			
54	23,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4,8
55											
56											
57	23,6	16,8	.	28,8	.	.	28,4	.	14,0		
58	.	.	.	.	20,0	22,8	.	32,8	.	.	5,2
59											
60	.	16,8	.	28,8	.	.	29,6	.	14,0		
61	25,6	.	.	.	20,0	22,8	.	33,2	.	.	6,0
62											
63	.	16,8	.	28,8	.	.	29,6	.	14,4		
64	26,4	.	.	.	20,0	22,8	.	33,2			
65	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6,0
66	.	16,8	.	28,8	.	.	29,6	.	14,4		
67	.	.	.	.	20,0	23,2	.	33,6			
68											
69	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6,0
70	26,8	17,2	.	28,8	.	.	29,6	.	14,4		
71	.	.	.	.	20,0	23,2	.	34,4			
72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6,0
73	.	17,2	.	28,8	.	.	29,6	.	14,4		
74	.	.	.	.	20,0	23,2	.	35,2			
75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6,0
76											
77	27,6	19,2	.	29,2	.	.	31,6	.	15,6		
78	.	.	.	.	20,8	24,0	.	36,8			
79	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6,8
80	.	19,2	.	31,2	.	.	31,6	.	15,6		
81	.	.	.	.	22,0	24,0	.	37,6			
82	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6,8

g $(NH_4)_2 SO_4$ per l	24,208	12,104	6,052	3,026	1,513	0,757	0,378	0,189	0,095	0,047	0,028
g Stickstoff per l	5,136	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	1,100	0,0050
Anzahl der Tage 83											
84	27,6	19,2	.	31,2	.	.	32,8	.	16,4		
85	.	.	.	.	22,0	24,0	.	38,8			
86											
87											
88	.	.	.	31,6	.	.	32,8	.	16,4	.	6,8
89	.	.	.	.	22,0	24,4	.	40,0			
90	28,0										
91	.	19,2	.	31,6	.	.	32,8	.	16,4		
92	.	.	.	.	22,0	24,4	.	40,0			
93											
94	.	19,2	.	31,6	.	.	32,8	.	16,4		
95	.	.	.	.	22,0	24,4	.	40,0			
96	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6,8
97	28,0										
98	.	19,2	.	31,6	.	.	33,6	.	16,4		
99	.	.	.	.	22,4	24,4	.	42,0			

C. 4. **Schwefelsaures Ammoniak.** **Weinhefe.**

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

g $(NH_4)_2 SO_4$ per l	24,208	12,104	6,052	3,026	1,513	0,757	0,378	0,189	0,095	0,047	0,028
g Stickstoff per l	5,136	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100	0,0050
Anzahl der Tage 1											
2											
3											
4	.	1,2	.	.	.	0,4	1,2	.	.	.	0,8
5	1,6	2,4	3,2	0,4	2,4	0,8	3,2	2,0	0,0	1,2	0,8
6	1,6	4,4	7,2	2,4	4,0	2,8	6,8	3,6	0,0	1,6	0,8
7	2,4	5,6	10,4	5,2	7,2	4,8	10,4	4,8	0,4	1,6	1,2
8	4,0	7,6	11,2	7,6	10,4	8,0	13,2	6,8	0,4	2,0	1,2
9	4,4	8,4	14,8	11,2	14,0	10,8	16,8	8,8	1,6	2,0	1,2
10	8,0	10,0	23,2	12,6	15,2	15,2	20,0	10,8	2,8	2,4	1,6
11	8,0	11,6	27,6	16,8	22,4	20,0	22,0	13,6	4,0	3,2	2,0
12	9,2	.	31,2	19,2	26,0	23,2	25,2	15,2	5,2	4,0	
13	.	13,6	.	.	.	.	.	.	.	.	2,4
14	11,6	14,0	36,0	23,6	30,4	29,2	30,8	18,0	6,4	4,8	2,4
15	12,8	16,0	40,4	26,0	33,2	30,8	32,8	19,2	7,2	4,8	2,8
16	14,4	17,2	44,0	28,8	36,4	34,4	35,6	20,8	8,4	5,4	2,8
17	15,6	18,4	46,8	31,2	39,2	36,8	38,0	22,0	8,8	6,0	3,2
18	16,4	19,2	49,2	32,8	41,6	39,6	40,0	23,2	9,6	6,0	3,2
19	17,2	.	51,2	35,2	44,0	41,2	42,4	24,0	10,4	6,4	
20	.	20,8	.	.	.	.	.	.	.	.	4,0
21	18,8	22,0	54,0	39,2	48,8	44,8	46,4	25,6	12,4	7,2	4,0
22	20,0	22,4	55,2	40,4	50,8	46,4	48,4	26,8	12,8	7,2	4,4
23	20,4	23,2	56,0	42,0	52,4	47,6	50,0	27,6	13,2	7,6	4,8
24	21,2	24,0	56,8	44,0	54,8	48,8	51,6	28,4	14,4	8,0	4,8
25	21,6	25,2	57,6	45,2	56,0	50,0	53,6	30,0	14,8	8,0	5,4
26	22,8	.	58,8	47,2	58,8	51,2	56,0	31,6	16,4	9,2	
27	.	25,6	.	.	.	.	.	.	.	.	5,4
28	22,8	26,4	58,8	48,8	60,8	52,4	57,6	32,0	17,2	9,2	5,4

g $(NH_4)_2 SO_4$ per l	24,208	12,104	6,052	3,026	1,513	0,757	0,378	0,189	0,095	0,047	0,0228
g Stickstoff per l	5,136	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100	0,0050
Anzahl der Tage											
29	23,2	26,4	59,2	49,6	62,0	52,8	58,4	32,4	17,6	9,6	5,4
30	23,2	27,2	59,2	50,0	62,8	52,8	59,2	33,2	18,0	9,6	5,4
31	23,6	27,6	59,6	51,2	64,0	53,6	60,0	33,2	18,8	10,0	6,0
32	24,4	27,6	60,0	52,0	64,8	54,0	61,6	34,0	19,6	10,4	6,4
33	24,4	.	60,0	52,4	.	54,4	62,4	34,8	20,0	10,4	
34	.	28,8	.	.	.	.	.	.	.	.	6,4
35	24,8	28,8	60,0	53,2	.	54,8	64,0	36,0	21,6	11,2	6,8
36	24,8	29,2	60,0	.	.	55,2	.	36,8	22,0	11,2	6,8
37	25,2	30,4	60,0	54,4	.	55,2	.	37,2	22,8	11,6	8,0
38	25,6	30,8	.	.	.	.	.	38,8	24,0	12,4	8,0
39	25,6	30,8	.	.	.	.	.	39,2	24,8	12,4	8,0
40	25,6	.	.	.	.	.	.	39,2	25,6	12,8	
41	.	32,4	.	.	.	.	.	.	.	.	9,2
42	27,6	.	.	.	.	.	.	41,6	26,8	14,0	
43	.	32,4	.	.	.	.	.	.	.	.	9,2
44	27,6	.	.	.	.	.	.	41,6	27,2	14,0	
45											
46	.	32,4	.	.	.	.	.	.	.	.	9,6
47	27,6	.	.	.	.	.	.	42,0	28,8	15,2	
48	.	32,4	.	.	.	.	.	.	.	.	10,0
49	28,0	.	.	.	.	.	.	44,8	30,0	15,6	
50	.	32,8	.	.	.	.	.	.	.	.	10,8
51	28,0	.	.	.	.	.	.	46,0	31,2	16,4	
52	.	33,2	.	.	.	.	.	.	.	.	10,8
53	28,0	.	.	.	.	.	.	46,4	32,0	16,4	
54											
55											
56											
57	.	33,2	.	.	.	.	.	.	.	.	12,0
58	28,4	.	.	.	.	.	.	49,2	34,0	16,6	
59						.					
60	.	33,2	.	.	.	.	.	.	.	.	12,4
61	28,4	.	.	.	.	.	.	49,6	35,2	18,0	
62											
63	.	33,8	.	.	.	.	.	.	.	.	12,4
64	28,4	.	.	.	.	.	.	49,6	35,2	18,8	
65											
66	.	33,8	.	.	.	.	.	.	.	.	12,4
67	28,4	.	.	.	.	.	.	50,8	36,4	18,8	
68											
69											
70	.	33,8	.	.	.	.	.	.	.	.	12,8
71	28,4	.	.	.	.	.	.	51,6	36,4	19,6	
72											
73	.	33,8	.	.	.	.	.	.	.	.	13,2
74	29,2	.	.	.	.	.	.	52,4	37,2	20,8	
75											
76											
77	.	34,4	.	.	.	.	.	.	.	.	14,4
78	30,0	.	.	.	.	.	.	54,8	39,2	21,6	
79											
80	.	34,4	.	.	.	.	.	.	.	.	15,6
81	31,4	.	.	.	.	.	.	55,6	41,2	22,8	
82											

g $(NH_4)_2 SO_4$ per l	24,208	12,104	6,052	3,026	1,513	0,757	0,378	0,189	0,095	0,047	0,0228
g Stickstoff per l	5,136	2,568	1,284	0,642	0,321	0,1605	0,0803	0,0401	0,0201	0,0100	0,0050
Anzahl der Tage 83											
84	.	34,4	.	.	.	.	.	.	.	.	16,4
85	31,2	.	.	.	.	.	.	56,4	42,0		
86	.	.	.	.	.	.	.	.		22,8	
87											
88	.	34,8	.	.	.	.	.	.	.	.	16,8
89	32,0	.	.	.	.	.	.	57,6	.	22,8	
90											
91	.	36,6	.	.	.	.	.	.	.	.	17,6
92	32,0	.	.	.	.	.	.	58,0	.	23,2	
93											
94	.	36,6	.	.	.	.	.	.	.	.	17,6
95	32,0	.	.	.	.	.	.	58,8	.	23,2	
96											
97											
98	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	18,4
99	32,8	.	.	.	.	.	.	60,0	.	24,0	
100											
101	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	18,8
102	33,2	.	.	.	.	.	.	61,2	.	24,4	
103											
104											
105											
106											
107	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	19,6
108	33,2	.	.	.	.	.	.	62,0	.	25,2	
109											
110											
111											
112											
113											
114											
115	.	.	.	.	.	.	.	.	.	26,8	20,4
116	34,0	.	.	.	.	.	.	63,9	.		
117											
118											
119											
120											
121											
122	34,4	.	.	.	.	.	.	.	.	27,2	

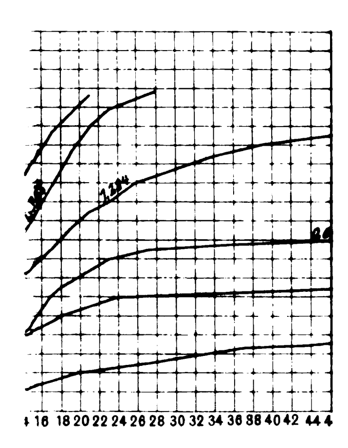
A. 5. Leucin aus Melasserückständen. Logos-Hefe.

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

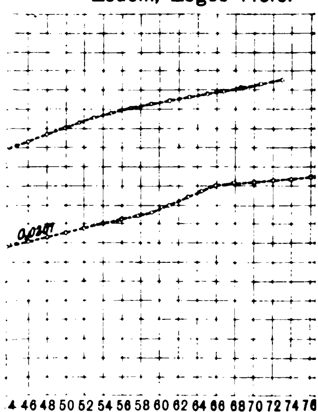
g Leucin per l	12	6	3	1,5
Anzahl der Tage 1				
2				
3				
4		2,0	2,0	
5	6,8	6,0	4,0	
6	14,4	10,8	6,0	0,4
7				

g Leucin per l	12	6	3	1,5
Anzahl der Tage				
8	20,4	12,0	6,8	1,2
9	24,8	16,0	10,0	1,6
10				
11	33,2	22,0	14,0	2,6
12	37,6	24,0	14,0	4,0
13	40,4	28,0	16,0	
14				
15	46,4	30,0	18,0	
16				
17				
18	50,0	34,0	22,0	6,4
19				
20				
21	54,4	40,0	25,2	7,2
22				
23	60,4	44,0	27,2	8,4
24				
25				
26	63,2	48,0	.	8,8
27				
28				
29				
30				
31		55,6	36,0	
32				
33				
34				
35	64,0	60,0	39,2	10,4
36				
37				
38				
39	64,4	63,2	42,0	10,8
40				
41				
42				
43	.	65,6	44,4	
44				
45				
46				
47	.	.	48,8	
48				
49	.	.	.	12,0

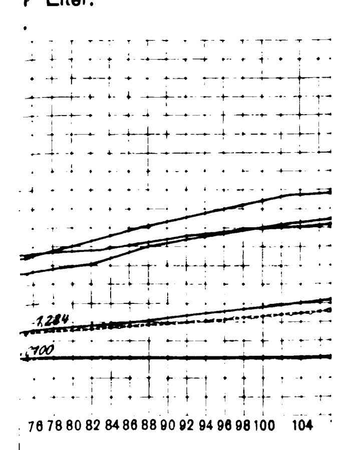


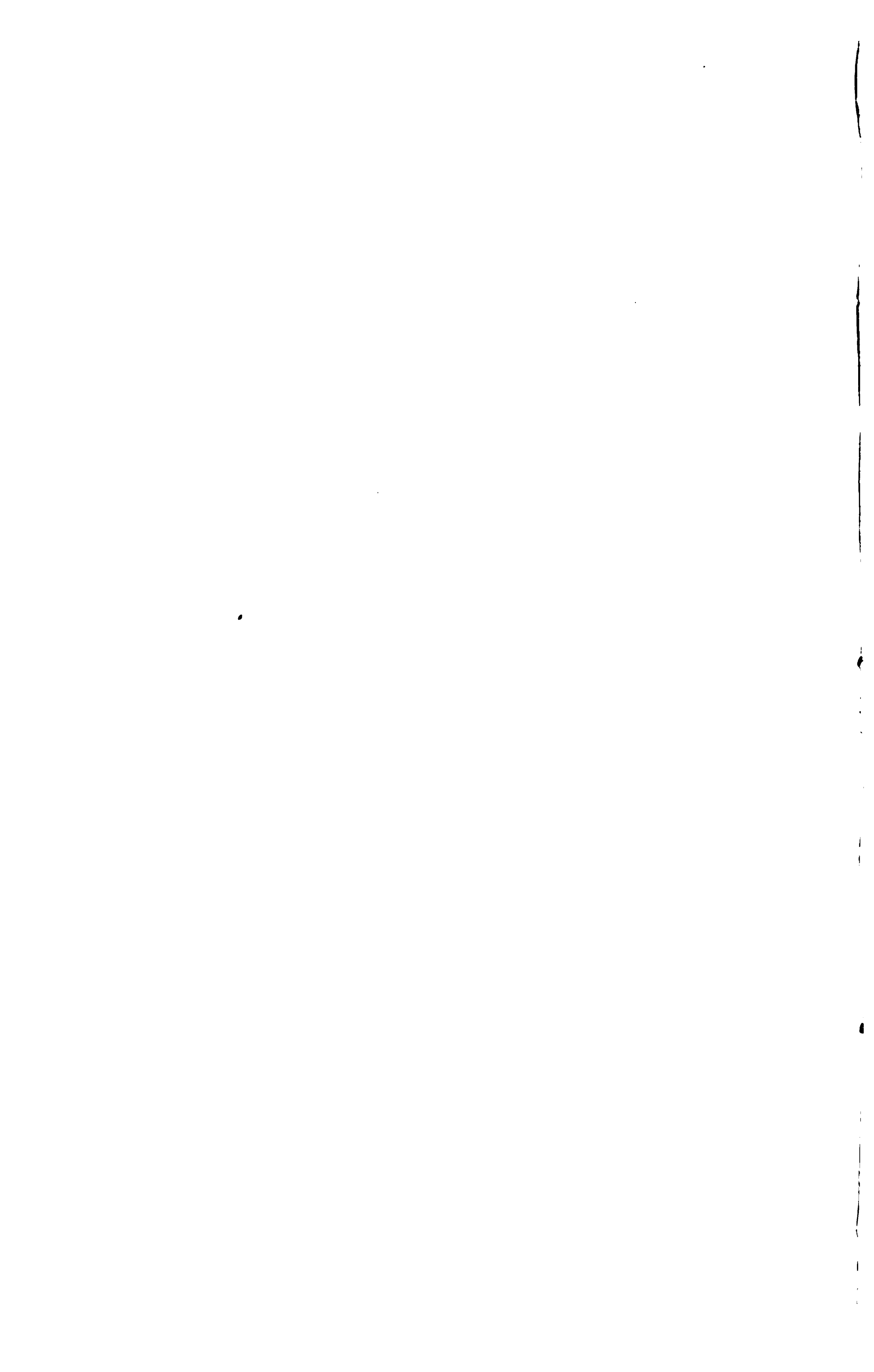


A. 2. Gärverlauf in g CO_2 per Leucin, Logos Hefe.



r Liter.





Beachtung verdient die Tatsache, daß selbst bei unregelmäßiger Angärung doch ein Ausgleich in Abhängigkeit von der gebotenen Stickstoffgabe hervortritt, sodaß sich im Verlaufe der Gärung nach den Tagen der Angärung die Gesetzmäßigkeit deutlich ausprägt.

2. Beim Leucin als Stickstoffquelle macht sich bei den zwei geprüften Hefetypen, Logos- und Frohberg-Hefe ein Ansteigen in der Gärungwirkung mit abnehmender Stickstoffkonzentration geltend. Dies tritt bei Logos-Hefe von 1,284 g Stickstoff pro Liter bis zu 0,0803 g bei Frohberg-Hefe dagegen bis zu 0,0401 g hervor. Für Logos-Hefe ist also 0,0803 g Stickstoff pro Liter die optimale Stickstoffgabe für intensive Vergärung, während die Gärungskurve für 0,0401 g schon unter die für 1,284 g liegt.

Bei 0,0201 liegt die Kurve naturgemäß noch tiefer. Frohberg-Hefe verlangt für optimale Gärungsintensität 0,0401 g. Bei 0,0201 g Stickstoff per Liter ist Abfall bis etwa zur Höhe der 1,284 g Kurve zu beobachten. Und die 0,0100 g Kurve liegt natürlich noch tiefer.

Im allgemeinen hat also wie beim Pepton Logos-Hefe größere Gärungsenergie als Frohberg-Hefe mit Leucin als Stickstoffquelle entfaltet. Es sind deshalb auch die Einflüße verschiedener Stickstoffkonzentrationen auf die Gärwirkung bei Logos-Hefe ausgeprägter als bei Frohberg-Hefe. Bei letzterer liegen alle Kurven näher zusammen.

3. Für Asparagin besteht mit 0,0803 g ein ausgeprägtes Maximum für alle drei Hefentypen. Logos-, Wein- und Frohberg-Hefe. Nur bei der Angärung zeigt 0,0401 g per Liter Stickstoff mit Frohberg-Hefe etwas höhere Gärungsenergie. Bei Weinhefe liegt die Kurve für 0,0401 g Stickstoff dagegen viel niedriger.

Bei noch niederer Konzentration von 0,0201 g Stickstoff per Liter wird die Gärung schleppend. Die Kurven für Wein- und Frohberg-Hefe liegen niedrig. Zwischen diese beiden Extremen fallen nun die Intensitäten höherer Stickstoffkonzentration als 0,0803 g Stickstoff per Liter. Die Kurve für 2,568 g fällt mit denen für 0,642, 0,321 und 0,1605 g bei Logos-Hefe und mit der für 0,642 g bei Weinhefe nahe zusammen. Die für 1,284 g liegt bei Logos-Hefe niedriger. Bei Frohberg-Hefe ist Ansteigen in der Gärintensität von 2,568 g zu 0,642, 0,0803 und 0,0401 g wieder deutlicher zu beobachten.

Wie beim Pepton und Leucin entfaltet bei Asparagin die Logos-Hefe eine höhere Gärungsenergie als die Frohberg-Hefe. Bei Asparagin liegt die der Weinhefe in der Mitte.

4. Für schwefelsaures Ammoniak ist 0,0803 g Stickstoff pro Liter im allgemeinen optimale Gabe. Für Logos-Hefe wurde keine geringere Konzentration geprüft. Frohberg-Hefe vergärt allerdings mit 0,0401 g Stickstoff noch etwas schneller, während bei Weinhefe die Kurven für 0,0803, 1,284 und 0,321 g Stickstoff nahe zusammen fallen. Die für 0,0401 g liegt hier schon bedeutend niedriger. Nach unten hin setzte sehr schleppende Gährung bei niedriger werdender Stickstoffgabe mit Frohberg- und Weinhefe, bei denen das geprüft wurde, ein. Der Abfall wird bei 0,0201 schon bedeutend und nimmt an Intensität mit 0,005 g Stickstoff stark zu. Immerhin ist bemerkenswert, daß mit so geringer Stickstoffgabe wie 0,0005 % noch Vergärung zu erreichen war, die bei genügend langer Zeit wohl bis zum Verschwinden der ganzen Zuckermenge fortgeschritten wäre, wie man aus der dauernden, wenn auch sehr allmählichen Gewichtsabnahme schließen kann.

Bei höherer Stickstoffkonzentration als 0,0803 g pro Liter kommen die Kurven zwischen die der maximalen und minimalen Vergärungsintensität zu liegen. Von 2,568 ist bei Logos-Hefe mit abnehmender Stickstoffmenge bis zu 0,0803 g Zunahme der Gärungsbeschleunigung zu beobachten. Dasselbe tritt bei Frohberg-Hefe von 2,568 g bis zu 0,0401 g mit völliger Regelmäßigkeit hervor, während sich der Einfluß bei Weinhefe infolge allzugroßer Nähe der Kurven höherer Konzentrationen etwas verwischt. 5,136 wirkt jedoch ausgeprägt verzögernd.

Wie bei Pepton, Leucin und Asparagin, zeigt Logos-Hefe bei schwefelsaurem Ammoniak größere Energie als Frohberg-Hefe. Wie beim Asparagin liegt die der Weinhefe in der Mitte.

5. Das aus Melasse-Rückständen isolierte Leucin wirkt ganz anders als das synthetische. Es ist ein Gemisch des Leucin und Isoleucin. Gemische wirken, wie aus den weiteren Tabellen hervorgeht, im allgemeinen weit besser als reine Körper. Doch kann darin nur der Grund für schnelleren Gärverlauf und nicht für eine Änderung in der Gesetzmäßigkeit gefunden werden.

Möglicherweise kann hier die Tatsache mitgesprochen haben, daß der Körper nicht völlig razemisiert war und optisch aktive

Eiweißzerfallprodukte günstiger auf die Gärwirkung der Hefe sind, als razemische Synthesenprodukte.

Faßt man die Resultate zusammen, so kommt man zuerst zu dem Schluß, daß eine für physiologische Einflüsse genügende Regelmäßigkeit in der Wirkung der Stickstoffgabe auf die Gärwirkung der Hefe erlangt wurde. Die Gärungsenergie der verschiedenen Hefen fällt ausnahmslos von der Logos- zur Weinhefe und weiter zur Frohberg-Hefe ab. Das Pepton, der osmotisch gering wirkende Stoff wirkt am günstigsten. Diesen Vorzug vor den drei anderen verdankt er wohl der Tatsache, daß bei ihm mit steigender Stickstoffkonzentration keine osmotische Hinderung auf die Hefezellen zu verzeichnen ist. Vielleicht findet die Hefe im Pepton auch zahlreiche Atomkomplexe die sie ihrem Eiweiß ungespalten einverleiben kann. Dagegen wirken Peptonkonzentrationen deren Stickstoffgehalt etwa dem Optimum der Wirkung der anderen Stickstoffquellen gleichkommen, viel schwächer als diese. Man erreicht also den höchsten ökonomischen Faktor, d. h. größte Gärbeschleunigung mit geringster Stickstoffgabe nicht beim Pepton, sondern beim Asparagin und zwar mit Logos-Hefe bei einer Stickstoffkonzentration von 0,0803 g per Liter.

Außer beim Pepton wird das Maximum der Gärungsintensität bei den drei anderen Stickstoffquellen und allen drei Hefetypen zwischen 0,0401 und 0,0803 g Stickstoff pro Liter erreicht. Bei Leucin-Frohberg-Hefe und schwefelsaurer von Ammoniak-Frohberg-Hefe liegt die 0,0401 g Kurve, bei allen anderen die 0,0803 g Kurve am höchsten.

Aber nicht nur die relative, sondern auch die absolute Intensität des Gärverlaufs wird durch die Form der Stickstoffquelle ziemlich unbeeinflußt gelassen. Bei derselben Stickstoffkonzentration wird so die Wirkung auf den Gärverlauf eine im ganz allgemeinen von der Art der geprüften Stickstoffkörper, immer mit Ausnahme von Pepton, unabhängige. Ob das auch auf andere Stickstoffnährsubstanzen der Hefe zu übertragen ist, ist noch gar nicht zu sagen. Aus anderen Beobachtungen von mir[1]) geht nämlich bei allerdings weit oberflächlicherer Prüfung hervor, daß die Zeit des Einsetzens der Gärung bei verschiedenen Stickstoffquellen sich

[1]) Vorstehend S. 131.

mit Verlängerung der Kette, in der sich die für die Erzielung einer gärkräftigen Hefe nötige Aminosäurerestgruppe findet, vermindert. Wie dem auch sei, für die drei Stickstoffquellen Leucin, Asparagin und schwefelsaures Ammoniak, herrscht für die Erzielung der Gärwirkung weit geringere Abhängigkeit von der Stickstoffquelle als von der Art der Hefe.

Aus alledem geht klar hervor, daß es ein zweckloser Einwand wäre, die Verzögerung im Gärverlauf bei supraoptimalen Stickstoffgaben beim Leucin oder gar Asparagin etwa in der zunehmenden Acidität der Nährlösungen suchen zu wollen. Die Aminosäuren mit so langen Ketten verhalten sich so, daß die Aminogruppe der Säuregruppe in hohem Maße das Gleichgewicht hält. Und beim neutralen Ammonsulfat kommt der Einwand gar nicht in Betracht. Trotzdem die Größe des Moleküls mit 131 für Leucin, 132 für Asparagin und 132 für schwefelsaures Ammoniak, eine bei der Auswahl vielleicht nicht genügend berücksichtigte, unerwünschte Übereinstimmung zeigt, so glaube ich doch nicht, daß man die gleichartige Wirkung des Stoffes in dem osmotischen Einfluß suchen darf. Denn es muß in Betracht gezogen werden, daß dieser sich ja nur zu dem viel größeren, durch den hohen Gehalt an Zucker hervorgerufenen, addiert.

Jedenfalls geht aus den angeführten Resultaten klar hervor, daß man nur aus einer großen Versuchsreihe in solchen Fällen zu Vergleichsresultaten kommen kann, wodurch gewissermaßen eine Entschuldigung für die Menge der gebotenen Zahlen gegeben wird.

II. Vergärung von Zuckerlösungen mit Kombinationen je zweier Stickstoffquellen und verschiedener gemischter Konzentrationen.

Bei der Verwendung verschiedener Stickstoffquellen in Kombinationen zu je zweien verwischen sich die vorher geschilderten Gesetzmäßigkeiten, welche die Wirkung nur je einer Stickstoffquelle sind. Im allgemeinen wird der Gärverlauf stark beschleunigt und zwar weit über die Grenze der Wirkung einer einzelnen Stickstoffquelle mit demselben Stickstoffgehalt hinaus. Die Gärungen kommen in verhältnismäßig kurzer Zeit zum Ablauf, sodaß die Frage erwogen werden kann, ob man auf diese Weise nicht überhaupt zur schnellsten Vergärung bei minimaler Einsaat kommen könnte. Doch wurde keine so hohe

Kombination von je zwei Stickstoffquellen. Logos-Hefe.

Gärverlauf in g. CO_2 per Liter.

per 1 g	Leucin 3,0	Leucin 1,5	Leucin 1,5	Leucin 0,75	Leucin 0,375	Leucin 3,0	Leucin 1,5	Pepton 1,122	Pepton 0,281	$(NH_4)_2SO_4$ 0,757	$(NH_4)_2SO_4$ 0,378	$(NH_4)_2SO_4$ 0,189
per 1 g	Pepton 2,244	Pepton 1,122	Aspar.+H_2O 1,718	Aspar.+H_2O 0,859	Aspar.+H_2O 0,429	$(NH_4)_2SO_4$ 0,757	$(NH_4)_2SO_4$ 0,378	Aspar.+H_2O 1,718	Aspar.+H_2O 0,429	Aspar.+H_2O 0,859	Aspar.+H_2O 0,429	Aspar.+H_2O 0,214
per 1 g Stickst.	0,642	0,321	0,4816	0,2408	0,1204	0,4816	0,2408	0,4816	0,1204	0,3212	0,1606	0,0803
Anzahl der Tage 1												
2												
3												
4	.	.	0,0	0,4	0,0	.	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,8	0,8	1,2	1,2	.	1,2	1,6	2,8	2,0	1,2	2,0	1,6
6	1,6	4,8	4,4	4,4	3,2	4,0	4,8	12,4	2,8	5,6	5,2	6,8
7	.	.	.	.	.	.	.	.	15,2			
8	12,2	16,8	14,8	13,2	9,2	10,0	13,2	22,8	20,0	14,8	13,6	14,8
9	20,0	23,2	19,6	18,8	15,6	13,6	17,6	27,6	26,4	19,6	18,4	18,8
10	27,2	24,8	26,0	24,8	22,0	18,0	22,8	34,4	31,6	25,2	24,0	20,8
11	36,8	34,8	32,0	30,4	27,6	21,6	27,6	40,4	36,8	31,2	29,2	30,0
12	40,0	40,8	37,2	35,6	32,4	24,8	25,2	45,6	41,6	35,6	34,0	34,4
13	46,0	46,0	42,8	40,0	36,4	28,0	37,6	50,0	.	40,4	34,4	38,8
14	.	.	.	.	.	.	.	.	50,8			
15	54,4	54,8	52,8	48,8	45,2	34,8	40,8	56,8	55,2	50,0	47,2	46,8
16	58,0	58,8	57,2	53,6	49,6	38,4	46,4	62,4	56,4	54,0	51,2	50,4
17	60,8	60,8	60,8	56,8	53,2	41,6	50,0	65,2	61,6	57,6	55,2	53,6
18	62,4	62,8	63,6	60,4	56,8	44,0	54,0	68,8	64,4	62,4	57,6	57,6
19	64,0	.	66,0	63,2	59,2	46,8	57,6	70,0	.	66,0	61,2	61,2
20	64,8	.	.	66,0	62,4	50,0	60,4	.	.	68,8	63,6	64,4
21												
22	65,6	.	.	68,4	66,0	55,2	64,0	.	.	71,2	67,2	68,0
23	66,0	.	.	.	.	56,0	64,0	.	.	72,0		
24	66,4	.	.	.	.	57,2	64,4					
25	66,4	.	.	.	.	58,8	64,8					
26	66,4	.	.	.	.	60,4						
27	.	.	.	.	.	62,0						
28												
29	.	.	.	.	.	64,4						

Konzentration von Pepton und einer andern Stickstoffquelle geprüft, daß eine Konkurrenz mit der Wirkung der hohen Peptongaben hätte aufgenommen werden können. Dagegen ist die ökonomische Ausnutzung der gebotenen Stickstoffmenge bei kombinierten Stickstoffquellen jedenfalls eine bessere und erreicht mit 0,189 g $(NH_4)_2SO_4$ und 0,214 g Asparagin, mit einem gemeinsamen Stickstoffgehalt von 0,0803 g, also wieder bei 0,0803 g Stickstoff pro Liter ihr Optimum in meinen Versuchen. Ob sie bei noch geringerer Stickstoffkonzentration in der Kombination zweier Stickstoffquellen noch besser würde, ist damit nicht ohne weiteres gesagt. Es erscheint jedoch wegen der Analogie mit den früheren Versuchen unwahrscheinlich. Spätere Prüfungen müssen hier entscheiden.

Bei allen gewählten Konzentrationen war die Gärung eine so schnelle und der Gärverlauf bei verschiedenen Konzentrationen ein so analoger, daß von einem Vergleich der Gärkurven abgesehen werden mußte. Sie wären zu nahe zusammen gefallen. Bei gleicher Stickstoffgabe als Leucin und Pepton überwiegt etwas noch die Wirkung des ersteren, da die kombinierte Stickstoffernährung zu langsamerem Gärverlauf führt als die derselben Stickstoffgabe mit Pepton. Pepton und Asparagin zusammen wirken dagegen so, daß die Gärung bei höherer Stickstoffgabe die bei geringerer fast garnicht mehr übertrifft. Es ergibt sich also hier wieder der schon früher beobachtete Einfluß der Gärverzögerung durch höhere Stickstoffkonzentration, der beim Leucin so viel ausgeprägter als beim Asparagin ist. Leucin und Asparagin und Asparagin und schwefelsaures Ammoniak zusammen lassen bei Konzentrationen innerhalb der geprüften Grenzen keine Wirkung auf den Gärverlauf erkennen, während Leucin und schwefelsaures Ammoniak zusammen bei höherer Konzentration des Stickstoffs den Gärverlauf etwas verzögern.

III. Der Einfluß von Leucin auf die Gärungsintensität von Acetondauerhefe.

Um zu prüfen, ob eine vom Wachstum ganz unabhängige Gärung durch die bloße Anwesenheit einer Stickstoffquelle beeinflußt werden kann, wurden Gärversuche mit Acetondauerhefe in Gegenwart der bei steigender Konzentration am stärksten hem-

menden Stickstoffnährsubstanz Leucin angesetzt. Die Tabelle enthält das Resultat.

Gärverlauf in g CO_2
durch Acetondauerhefe in Gegenwart von Leucin.

Tage	75 ccm Lösung, 30 g Zucker, 15 g Dauerhefe mit			
	ohne	0,1125 g	0,225 g	0,454 g Leucin
1	3,2	3,7	1,4	1,1 g CO_2
2	5,5	4,6	2,7	2,0 g CO_2
3	6,3	6,0	3,2	2,5 g CO_2
4	6,3		3,2	2,5 g CO_2
5			3,3	

Die Leucinkonzentrationen waren so gewählt, daß sie den früher verwandten entsprachen d. h. 0,454 g Leucin in 75 ccm ist wie 6 g Leucin pro Liter. Die Zuckerkonzentration mußte natürlich der Vergärung mit Acetondauerhefe angepaßt werden. Ein Antiseptikum wurde des möglichen hemmenden Einflusses auf die Gärung wegen nicht angewandt. Doch wurden die Lösungen nach Beendigung der Gärung mikroskopisch rein befunden und zugleich durch Abimpfen auf Most bewiesen, daß keine lebenden Hefezellen zugegen waren, da keine Gärung des Mostes eintrat.[1])

Das klare Resultat der Versuche ist, daß Leucin mit steigender Konzentration die Gärung durch abgetötete Hefe hemmt, daß also ein vom Wachstum unabhängiger Einfluß auf die Gärkraft zu verzeichnen war. Die Zymase erscheint also gegen die Wirkung von Leucin nicht unempfindlich zu sein.

II. Abschnitt.

Der Einfluß verschiedener Stickstoffquellen und Konzentrationen auf die Zahl der gebildeten Hefezellen.

Nach beendeter Gärung wurde den Lösungen 1 ccm entnommen und mit einem oder mehreren Kubikzentimetern verdünnter Schwefelsäure versetzt. Nach mehrtägigem Stehen, als die Hefezellen sich völlig voneinander gelöst hatten, wurde dann

---

[1]) Vergleiche hierzu H. Pringsheim Ber. der d. chem. Gesellschaft. 39, 3713. 1906.

ihre Zahl mit der Zählkammer ermittelt. Es wurden zahlreiche Zählungen derselben Kultur vorgenommen und mit der Zählung neuer Proben so lange fortgefahren, bis ein neues den Durchschnitt der früheren Resultate nicht mehr änderte. Daß trotz alledem bei der Ungenauigkeit der Methode besonders bei geringer Hefezahl keine allzu genauen Resultate erhalten wurden, wird niemanden wundern, der die Schwierigkeit einer genauen Ermittlung der Hefezahl kennt. Der Mangel war aber nicht der der Handhabung, sondern der der Methode selbst.

Die Resultate auf Millionen Hefezellen pro Kubikzentimeter berechnet sind in der folgenden Tabelle enthalten.

Zahl der Hefezellen in Millionen pro ccm nach beendeter Gärung.

I. Logos-Hefe.

Pro Liter g Stickstoff	A. als Pepton g	A. Millionen pro ccm	B. Leucin g	B. Millionen pro ccm	C. Asparagin $+ H_2O$ g	C. Millionen pro ccm	D. $(NH_4)2SO_4$ g	D. Millionen pro ccm	E. Leucin aus Melasserückständen g	E. Millionen pro ccm
10,27	71,80	145,0								
5,14	35,90	130,0								
2,568	17,95	88,0			13,744	I. 16,0 II. 20,5			12,0	50,4
1,284	8,957	55,6	12,0	25,1	6,872	21,5	6,052	17,4	6,0	22,0
0,642	4,488	42,4	6,0	28,0	3,436	42,8	3,026	20,0	3,0	22,0
0,321	2,244	53,6	3,0	32,6	1,718	52,4	1,513	37,6		
0,161	1,122	34,0	1,5	31,6	0,859	40,2	0,757	16,4		
0,0803	0,561	27,0	0,75	23,7	0,429	24,4	0,378	20,0		
0,0401			0,375	20,7						

g Stickstoff			Millionen pro ccm
0,9632	Pepton Leucin	2,244 3,0	40,2
0,4816	Pepton Leucin	1,122 1,50	24,0
0,8025	$(NH_4)2SO_4$ Leucin	0,757 3,0	26,0
0,4013	$(NH_4)2SO_4$ Leucin	0,378 1,50	28,0

II. Wein-Hefe.

Pro Liter		D.		
g Stickstoff		$NH_4/2SO_4$	Millionen pro ccm	
1,284		6,052	18,7	
0,642		3,026	14,8	
0,321		1,513	20,0	
0,161		0,757	19,2	

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen der gewählten Stickstoffquellen auf die Zahl der gebildeten Hefezellen ist ein ausgeprägter. Auch läßt sich ein gewisser Zusammenhang zwischen der Zahl der gebildeten Hefezellen und der Gärungsintensität bemerken. Am klarsten zeigt sich das beim Pepton. Hier ist die Analogie, mit einer Ausnahme bei 0,321 g Stickstoff pro Liter —, die wohl auf einen Beobachtungsfehler zurückzuführen sein wird, — eine völlige, höhere Stickstoffgabe veranlaßt höhere Hefezahl und schnellere Vergärung. — Beim Leucin liegen die Hefezahlen sehr nahe beieinander; in allen Fällen ist die Zahl der mit Leucin gebildeten Zellen bei gleicher Stickstoffgabe geringer als beim Pepton. Bei optimaler Stickstoffkonzentration des Leucins entfaltet also die Einheit der Hefezellen größere Gärungsenergie als bei gleichgroßer Stickstoffgabe mit Pepton. Die optimale Vergärung fällt auch nicht mit der maximalen Hefezahl zusammen. Dazu kommt, daß man nach dem Vorbilde des Peptons bei verschieden schnell verlaufenden Gärungen auch bedeutende Verschiedenheiten in der Zahl der wirkenden Zellen hätte erwarten können. Daß das nicht der Fall ist und daß in dieser Beziehung, um es vorweg zu nehmen, Asparagin und schwefelsaures Ammoniak sich dem Leucin anschließen, ist ein neuer Beweis für die geringere Regelmäßigkeit in der Wirkung dieser Stickstoffquellen auf die Ernährung uud Gärwirkung der Hefezellen.

Mit Asparagin läßt sich eine größere Zahl von Hefezellen in der Volumeneinheit als mit Leucin erzielen, 52,4 gegen 32,6 Millionen Zellen. Es lassen sich jedoch nicht annähernd so hohe Zahlen wie beim Pepton erreichen. Das Maximum der Zellenbildung liegt bei 0,321 g Stickstoff pro Liter und der Abfall ist

von dieser Konzentration an nach oben und unten ein regelmäßiger. Das Optimum der Gärwirkung entspricht aber auch hier wieder gar nicht dem Maximum der Zellenzahl. Es wird im Gegenteil durch nur 24,4 Millionen pro Kubikzentimeter also mit weniger als der halben Maximalzahl erreicht. Im besonderen und allgemeinen besteht hier kein Zusammenhang zwischen Zellenzahl und Gärwirkung.

Schwefelsaures Ammoniak gestattet nur eine wenig größere Aufzucht von Hefezellen als Leucin, folglich eine geringere als Asparagin oder gar Pepton. Das Maximum liegt hier bei derselben Stickstoffkonzentration 0,321 g pro Liter, wie beim Asparagin. Der Abfall nach oben und unten tritt regelmäßig, wenn auch weniger scharf hervor, wenn man annimmt, daß der Unterschied von 16,4 zu 20 Millionen bei 0,161 und 0,0803 g pro Liter innerhalb der Fehlergrenze liegt. Jedenfalls ist er nicht markant. Wichtig ist, daß auch mit Weinhefe mit derselben Stickstoffgabe maximaler Zellenzahl wie bei Logos-Hefe erzielt wurde, und daß auch da Abfall nach oben und unten zu konstatieren war. Hier sind die Unterschiede noch viel geringer.

Zusammenfassend geht also aus den Resultaten hervor, daß wie bei der Gärwirkung nur beim Pepton proportionaler Zusammenhang zwischen Stickstoffgabe und Zellenzahl zu finden war. Wie bei der Gärwirkung existiert für die Zellenbildung ein Maximum der Stickstoffkonzentration, von dem aus Abfall nach oben und unten zu beobachten war. Dieses Maximum liegt aber nicht bei derselben Stickstoffgabe wie das der Gärwirkung, sondern bei viermal höherer, nämlich 0,321 g Stickstoff pro Liter gegen 0,0803 g Stickstoff pro Liter für optimalen Gärverlauf.

Aus den geringen Angaben über die Wirkung kombinierter Stickstoffquellen auf die Zellengabe möchte ich keine Schlüsse ziehen. Es schien hier kaum lohnend ein reichliches Zahlenmaterial zu sammeln.

Dritter Abschnitt.

Der Einfluß verschiedener Stickstoffquellen und Stickstoffkonzentrationen auf die Stickstoffentnahme aus der Lösung durch verschiedene Hefen.

A. Bei minimaler Einsaat.

Daß man wegen des Austritts von Stickstoff aus der Hefe während der Gärung keine großen Schlüsse aus dem Stickstoffgehalt der Hefe nach beendeter Gärung ziehen darf, wurde schon bei der Besprechung der Arbeiten früherer Autoren häufig hervorgehoben. Zum Überfluß zeigt die folgende Tabelle noch, wie gering der Einfluß verschiedener Stickstoffkonzentrationen auf diesen Faktor ist. Es wurden in ihr und den folgenden Fällen die für 250 ccm Lösung gefundenen Werte angegeben, da man nach meiner Meinung, schon der Beurteilung der Fehlergrenze wegen, die wirklichen, analytischen Resultate nicht unterdrücken soll. Andererseits wäre durch eine doppelte Angabe mit Umrechnung pro Liter eine unnütze Belastung des Zahlenmaterials eingetreten, was der Übersichtlichkeit nur geschadet hätte. Durch Multiplikation mit vier kann man ja so leicht zu Werten pro Liter kommen.

Stickstoffgehalt der Hefe nach Vergärung von 250 ccm 15%iger Zuckerlösung. **Logos-Hefe.**

g Substanz		mit g Stickstoff	g Stickstoff der Hefe
Pepton	0,281	0,1204	0,0278
Asparagin + H_2O	0,429		
Pepton	0,070	0,0301	0,0196
Asparagin + H_2O	0,107		
Leucin	0,375	0,1204	0,0203
Asparagin + H_2O	0,429		
Leucin	0,178	0,0602	0,0200
Asparagin + H_2O	0,214		
Leucin	0,089	0,0301	0,0202
Asparagin + H_2O	0,107		
$(NH_4)2\,SO_4$ . . .	0,189	0,0803	0,0216
Asparagin + H_2O	0,214		
$(NH_4)2\,SO_4$ . . .	0,095	0,0401	0,0199
Asparagin + H_2O	0,107		
$(NH_4)2\,SO_4$ . . .	0,048	0,0201	0,0199
Asparagin + H_2O	0,054		

a. Der Einfluß der Stickstoffkonzentration auf den am Ende der Gärung gefundenen Stickstoffumsatz.

Die Ermittlung der Stickstoffmenge, die die Hefe der Nährlösung entzieht, stößt bei den meisten Stickstoffquellen, wie schon früher erläutert, auf unumgängliche analytische Schwierigkeiten. Selbst beim Asparagin kommt man bei einer Prüfung auf zurückbleibenden Amidstickstoff, wie sie Hayduck ausführte, zu keinen ganz richtigen Resultaten, da die Hefe gerade so gebundenen Stickstoff ausscheidet und in die Lösung entläßt. Die Untersuchungen von Juslin[1]) ergaben, daß Pepton während der Gärung aus dem Hefeeiweiß gebildet wird. Es befindet sich dann in der Nährflüssigkeit gelöst und betrug z. B. in einem Falle auf 100 Teile Hefestickstoff 13,3 Teile Peptonstickstoff. Daneben waren noch 5,8 Teile Eiweißstickstoff in der Gärflüssigkeit enthalten. Gerade die letztere Angabe läßt die schon älteren Resultate sehr wenig wahrscheinlich erscheinen. In welcher Form sollte denn Eiweißstickstoff im Gegensatz zu Peptonstickstoff aus der Hefe in die Nährlösung gelangen? Es könnte sich da nur um den Stickstoff toter Zellen handeln, da der lebender in Form von Eiweiß die Zelle nicht verlassen kann. Märker gibt dann auch weiter an, daß nur die stärker sauren Branntweinmaischen viel Pepton enthalten, während der Peptongehalt der wenig sauren Bierwürzen gering ist. Es wird sich wohl in all diesen Fällen um eine Spaltung des Eiweißgehaltes der Nährlösung, die durch die Säure begünstigt wird, und nicht um den Eiweißzerfall der Hefe handeln. Denn Iwanoff (a. a. O. Anmerkung S. 479) konnte nach der Vergärung reiner Zuckerlösung keine Biuretreaktion in der Lösung finden. Er gibt weiter an, daß im Gegensatz zu Nägeli, der die Stickstoffausscheidung in Form von Albumosen und Pepton beobachtet haben wollte, auch Hahn und Geret[2]) bei der Selbstverdauung der Hefe nur Spuren von Albumosen und kein Pepton fanden. Auch wäre die Methode von Hayduck für zahlreiche Versuche etwas langwierig. Wie bedauerlich es nun auch sein mag, daß man nicht verschiedene Stickstoffquellen auf den Verlust des Stickstoffgehaltes der Hefe während der Gärung prüfen kann, um zu Vergleichsresultaten zu gelangen, wie verhältnismäßig ungeeignet auch

[1]) Nach Märker, Handbuch der Spiritusfabrikation **1908**, 489.

[2]) Die Zymasegärung S. 307.

eine so getrennt stehende Stickstoff-Quelle wie das schwefelsaure Ammoniak auch sein mag, so mußte man sich doch mit den an diesem einen Körper gewonnenen Resultaten begnügen. Denn nur bei ihm ist man nach den Untersuchungen von Pasteur[1]) sicher, daß er während der Gärung nicht gebildet wird und nur für ihn existiert eine kurze und verläßliche Analysenmethode in Gegenwart anderer leicht zersetzlicher Eiweißsubstanzen[2]). Von der Anwendbarkeit dieser Methode auf Most hat sich Duclaux[3]) noch besonders überzeugt und Mauceau[4]) wie Laborde[5]) haben sich vergewissert, daß die von Pasteur angewandte Destillation mit gebrannter Magnesia nach Boussignault mit einer andern von Muntz[6]), der Soda bei niedriger Temperatur und Ammoniakdestillation unter vermindertem Druck anwandte, übereinstimmende Resultate gibt.

Im hiesigen Laboratorium wurde dann aber noch gefunden, daß der Umschlag mit Lackmoid als Indikator nach solchen Destillationen mit Magnesia erst scharf wird, wenn man die saure Flüssigkeit in der Vorlage vor der Titration kocht. Alle Ammoniakbestimmungen in vergorenen Lösungen wurden nach dieser Methode ausgeführt, während der Stickstoffgehalt der Hefe nach Kjeldahl ermittelt wurde.

Führt man solche Bestimmungen an Lösungen durch, die bei minimaler Einsaat, in Gegenwart verschiedener Stickstoffkonzentrationen an schwefelsaurem Ammoniak, vergoren worden waren, so ermittelt man dadurch nicht nur den Verbrauch der Hefe an Ammoniakstickstoff und den Stickstoffgehalt der Hefe am Schluß der Gärung, sondern auf indirektem Wege auch die Menge Stickstoff, welche aus der Hefe in die Nährlösung wiederum entlassen worden ist, da diese ja die Differenz zwischen dem Verbrauch des Ammoniakstickstoffs und dem Stickstoffgehalt der Hefe bedeutet.

---

[1]) Pasteur, Mémorie sur la fermentation alcoolique. Ann. de chimie et de physique 58, 376. 1859.

[2]) Duclaux, Traité de Microbiologie 3, 188; Pasteur, a. a. O. S. 378.

[3]) Duclaux, Ann. de l'Ecole Normale Supérieure 2, 1866.

[4]) Bulletin de la Société des viticulteurs de France et d'ampélographie No. 7 et 8, 1898.

[5]) Ann. de l'Institut Pasteur 12, 519. 1898.

[6]) Ann. de la Science Agronomique française et étrangère 1896.

Dabei kommt allerdings die Möglichkeit noch in Frage, daß die Hefe einen Teil ihres abgesonderten Stickstoffs wieder verbraucht hat, was durch Resultate des dritten Teiles wahrscheinlich gemacht wird. Dadurch würde sich jedoch nur ein Fehler der Bestimmungsmethode herausstellen, der die gefundenen Resultate in ihren Aussagen noch verstärken würde, d. h. der Stickstoffumsatz der Hefe während der Gärung würde sich dadurch nur vermehren. Die folgenden Tabellen enthalten die Resultate solcher Bestimmungen.

Stickstoffumsatz der Hefe während der Gärung mit Ammoniak als Stickstoffquelle.

250 ccm Lösung mit 15 % Zucker.

Vor der Vergärung		Logos-Hefe		Weinhefe					
g $(NH_4)_2SO_4$	g Stickstoff	Rest-Stickstoff als Ammoniak-Stickstoff	Verbrauch des Ammoniak-Stickstoffs durch die Hefe	Rest-Stickstoff als Ammoniak-Stickstoff	Verbrauch des Ammoniak-Stickstoffs durch die Hefe	Stickstoffgehalt der Hefe nach der Gärung	Stickstoffgehalt der Lösung nach der Gärung	Abgabe des Stickstoffs der Hefe an die Lösung während der Gärung	Verhältnis d. Stickstoffgehaltes zum Stickstoffverbrauch durch die Hefe
abgewogen	bestimmt	bestimmt	berechnet	bestimmt	berechnet	bestimmt	berechnet	berechnet	
3,026	0,6356	0,5682	0,0674	0,5978	0,0378	0,0067	0,6289	0,0311	1 : 5,6
1,518	0,3178	0,2646	0,0532	0,2268	0,0910	0,0179	0,2999	0,0731	1 : 5,1
0,757	0,1589	0,1142	0,0447	0,1092	0,0497	0,0119	0,1470	0,0378	1 : 4,2
0,378	0,0794	0,0347	0,0447	0,0380	0,0414	0,0109	0,0685	0,0305	1 : 3,8
0,189	0,0397	0,0125	0,0272	0,0074	0,0323	0,0096	0,0301	0,0227	1 : 3,4
0,095	0,0198	0,0	0,0198	0,0	0,0198	0,0092	0,0106	0,0106	1 : 2,1
0,048	0,0099	0,0	0,0099	0,0	0,0099	?	?	?	

Bei Betrachtung der Resultate beobachtet man mehrere Gesetzmäßigkeiten. Erstens nimmt mit steigendem Stickstoffgehalt der Lösung der Verbrauch des Ammoniakstickstoffs durch die Hefe während der Gärung zu und zwar regelmäßig mit wachsendem Gehalt der Lösung an Stickstoff, mit einer Ausnahme die, da sie durch geringen Stickstoffgehalt der Hefe nach der Gärung ergänzt wird, wohl auf die starke osmotische Hinderung so konzentrierter Lösungen auf die Weinhefe zurückzuführen sein dürfte. Die zwischen den Resultaten mit Logos- und Weinhefe gefundene Übereinstimmung ist alles, was man in solchen Fällen erwarten kann.

Der Verbrauch des Ammoniakstickstoffs ist sehr groß und übertrifft den Gehalt der Hefe an Stickstoff, der mit wachsender Stickstoffkonzentration der Lösung gleichfalls zunimmt, je nach der Konzentration. Das Verhältnis des Verbrauchs an Ammoniakstickstoff zum Stickstoffgehalt der Hefe steigt ebenfalls mit wachsender Konzentration der Ammoniumjonen. Wenn dieses Verhältnis nun allmählich aufsteigend wie 5:1 wird, so geht daraus klar hervor, wie wenig Wert die früheren Angaben über den Stickstoffverbrauch durch die Hefe während der Gärung haben, die aus der alleinigen Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Hefe am Schluß der Gärung gefolgert waren.

Wenn nun auch zugegeben werden muß, daß bei Pepton als Stickstoffquelle weniger markante Unterschiede zwischen Stickstoffgehalt der Hefe und Stickstoffverbrauch durch die Hefe herrschen mögen, so wird man doch auch hier kaum schlußfolgern dürfen, daß die Abgabe des Stickstoffs aus der Hefe an die Lösung ganz zu vernachlässigen ist.

Die am Ammoniak gewonnenen Resultate aber auf die andern Stickstoffquellen, wie Asparagin und Leucin d. h. die Aminosäuren zu übertragen, ist man berechtigt. War doch die Wirkung dieser, wie aus dem Vorhergehenden hervorgeht, eine dem Ammoniak sehr analoge.

In einer weiteren Tabelle (Seite 200) sind die Resultate zusammengefaßt, die nicht nach Ablauf der Vergärung, sondern nach einer bestimmten für die Konzentrationen gleicher Zeitspanne von 100 Tagen mit der langsam gärenden Frohberg-Hefe erhalten wurden.

Bestimmt man den Stickstoffumsatz nicht am Ende der Vergärung einer 15%igen Zuckerlösung, sondern nach hunderttägiger Vergärungszeit, so zeigt sich doch dasselbe prinzipielle Verhalten, das Ansteigen des Verbrauchs an Ammoniak-Stickstoff mit zunehmender Stickstoffkonzentration. Nach völliger Vergärung von 15% Zucker wie nach 100tägiger Gärung findet von 0,095 g Stickstoff oder etwa bei 0,4 g Stickstoff als Ammoniak pro Liter völlige Ausnutzung bei drei verschiedenen Hefetypen des gebotenen Stickstoffs statt. Bei den höchsten Konzentrationen findet sich auch bei Frohberg-Hefe eine Hinderung im Stickstoffumsatz.

Stickstoffumsatz der Hefe während 100tägiger Gärung mit Ammoniak als Stickstoffquelle.

250 ccm Lösung mit 15 % Zucker. Frohberg-Hefe.

Vor der Gärung		Rest-Stickstoff als Ammoniak-Stickstoff	Verbrauch des Ammoniak-Stickstoffs durch die Hefe
g $(NH_4)_2SO_4$	g Stickstoff		
abgewogen	bestimmt	bestimmt	berechnet
6,052	1,2712	I. 1,2296 / II. 1,2266 } 1,2281	0,0431
3,026	0,6356	0,5801	0,0555
1,513	0,3178	—	—
0,757	0,1589	0,1120	0,0469
0,378	0,0794	0,0362	0,0432
0,189	0,0397	0,0049	0,0349
0,095	0,0198	0,0	0,0198
0,047	0,0099	0,0	0,0099
0,024	0,0049	0,0	0,0049
0,012	0,0025	0,0	0,0025

Nur in dieser Hinderung läßt sich ein schwacher Zusammenhang zwischen der Gärwirkung und dem Stickstoffverbrauch der Hefe bemerken. Sonst kann man den Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren ablehnen und den Satz aussprechen, **zwischen Stickstoffverbrauch und Gärwirkung besteht bei wachsender Hefe, die sich aus minimaler Aussaat entwickelt, kein Zusammenhang.** Denn während der Stickstoffumsatz mit wachsender Konzentration der Stickstoffnahrung zunimmt, liegt das Optimum der Gärwirkung bei niederer Konzentration.

Der Stickstoffumsatz bei fortschreitender Gärung und derselben Stickstoffkonzentration.

Nachdem gezeigt worden war, daß der Verbrauch des Ammoniakstickstoffs während der Gärung bei wachsender Hefe den Erntestickstoffgehalt der Hefe um ein Mehrfaches übertrifft, drängte sich naturgemäß die Frage auf, zu welcher Zeit der Verbrauch des Ammoniaks sich abspielt, besonders ob er etwa während der Wachstumsperiode der Hefe zum Abschluß kommt? Zur Entscheidung dieser Frage wurden 18 Gärflaschen genau derselben Größe und Form mit der nach den Angaben der folgenden Tabelle zusammengesetzten Nährlösung beschickt und mit einer durch

Zählung festgestellten Zahl in Most vorgezüchteter gut gewaschener Hefezellen beimpft. Die so vorbereiteten Flaschen wurden nach dem Verweilen im Brutzimmer täglich gewogen. Schon dabei zeigte sich, daß trotz der genau übereinstimmenden Versuchsanstellung keine große Regelmäßigkeit im Hefewachstum oder Gärverlauf zu erzielen war. Die Angabe aller Gärverlaufe würde zu weit führen. Genüge es hier anzugeben, daß z. B. am 12. Tag ein Schwanken zwischen 3,7 und 6,3 g Kohlensäureverlust pro 250 ccm Lösung gefunden wurde, das sich nach dem 18. Tage mit einem Unterschiede von 6,1 auf 10,1 g und am 23. Tage von 7,8 auf 12,8 g CO_2 noch nicht ausgeglichen hatte.

Stickstoffumsatz bei fortschreitender Gärung.

(Bestimmt aus getrennten Gärversuchen.)

250 ccm 15 % Zucker 0,757 g $(NH_4)_2SO_4$ • 0,1589 g Stickstoff. Logos-Hefe.

Anzahl der Tage	Hefezahl pro ccm	g CO_2	g Stickstoff der Hefe	Rest-Ammoniak-Stickstoff	Verbrauch des Ammoniak-Stickstoffs	Stickstoff aus der Hefe an die Lösung abgegeben
	bestimmt	bestimmt	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet
0	32 000	—	I. 0,0007 II. 0,0007	0,1589	—	—
1	36 Mill.	—	I. 0,0084 II. 0,0098	I. 0,1452	0,0137	0,050
2	46,8 „	—	I. } II. } 0,0102	I. 0,1466 II. 0,1452 III. 0,1452	0,0132	0,0030
3	57,2 „	—	I. 0,0112	I. 0,1466 II. 0,1474	0,0119	0,0007
4	58,8 „	—	I. 0,0122	I. 0,1456	0,0133	0,0011
8	62,4 „ 80,0 „	2 g CO_2 4,4 g CO_2	I. 0,0096 II. 0,0154	I. 0,1351 II. 0,1302	0,0238 0,0287	0,0142 0,0133
12	86,4 „ 70,4 „	5,5 g CO_2 5,3 g CO_2	I. 0,0146 II. 0,0147	I. 0,1183 II. 0,1204	0,0406 0,0385	0,0260 0,0238
18	— —	6,7 g CO_2 6,7 g CO_2	I. 0,0131 II. 0,0133	I. 0,1309 II. 0,1302	0,0280 0,0287	0,0149 0,0154
23	— —	9,7 g CO_2 9,7 g CO_2	I. 0,0151 II. 0,0157	I. 0,1421 II. 0,1484	0,0168 0,0105	0,0017 —0,0052
32	— —	13,3 g CO_2 13,4 g CO_2	I. 0,0146 II. 0,0123	I. 0,1249 II. 0,1323	0,0340 0,0266	0,0194 0,0143

Noch weniger genau war die Übereinstimmung der Resultate an verschiedenen Tagen über den Stickstoffverbrauch und die Stickstoffausgabe durch die Hefe. Während z. B. in einem Falle

am 12. Tage schon 0,0406 g Ammoniakstickstoff verschwunden war, hat die Hefe in einem anderen am 23. Tage erst 0,0105 g verbraucht. Auch war, wie z. B. am 32. Tage, die Übereinstimmung keine gute, wenn man zur Analyse Flaschen aussuchte, die gerade denselben Kohlensäureverlust erlitten hatten. Es zeigte sich also klar, daß aus schwer zu erklärenden Gründen, mit einer solchen Versuchsanstellung in getrennt vergorenen Lösungen nichts für unseren Zweck zu erreichen war. Daß die Tabelle und die Angaben über den Gärverlauf hier doch Platz finden, findet dadurch seine Erklärung, daß erstens vor dieser Methode der Bestimmung so diffiziler Einflüsse für spätere Fälle gewarnt werden soll und zweitens weil durch die Unregelmäßigkeit im Gärverlauf so gleichartiger Versuche eine gewisse Erklärung für die Tatsache gegeben wird, daß die früher aufgeführten Versuchsreihen bei der Vergärung verschiedene Stickstoffkonzentrationen enthaltender Lösungen auch ein paar aus der Reihe fallender Gärverlaufe gaben.

Aus der Tabelle geht noch mit genügender Sicherheit hervor, daß die Vermehrung bei einer Aussaat von 32000 pro ccm nicht vor dem 12. Tage beendet war. — Weiterhin war das Maximum des Stickstoffgehaltes der Hefeernte 0,015 g Stickstoff.

Diese beiden Angaben haben für die folgende Versuchsreihe Interesse, weil sie bei ihr nicht ermittelt werden konnten. Für sie wurde ein größeres Volumen einer Nährlösung mit 0,04 % oder 0,1 g Stickstoff auf 250 ccm in einer Flasche mit Logos-Hefe beimpft und an verschiedenen Tagen mit steriler Pipette dreimal je 100 ccm entnommen. Zwei dieser dienten zu Parallelbestimmungen für den unverbrauchten Ammoniakstickstoff, die dritten zur Alkoholbestimmung. Denn mit dieser mußte zur Kontrolle des Gärverlaufs bei der Vergärung eines so großen Volumens der Stickstoffverbrauch in Beziehung gesetzt werden. Leider mußte man auch auf die Bestimmung des Stickstoffgehalts der Hefe verzichten, da genaue Verteilung der Zellen in einem großen Volumen Flüssigkeit nicht zu erreichen ist.

Stickstoffumsatz bei fortschreitender Gärung.
Logos-Hefe.

(Bestimmt aus demselben Gärversuch.)

100 ccm zur Analyse entnommen. 15 % Zucker. 0,04 g Stickstoff.

Anzahl der Tage	Rest-Ammoniak-Stickstoff	Verbrauch des Ammoniak-Stickstoffs	% Alkohol	Auf 250 ccm berechnet: Rest-Ammoniak-Stickstoff	Verbrauch des Ammoniak-Stickstoffs	Differenz
0	0,04 g	0,0	0	0,10	0,0	0,0
3	I. 0,0363 II. 0,0364 } 0,0363	0,0037	0	0,0901	0,0092	0,0092
6	I. 0,0346 II. 0,0336 } 0,0341	0,0059	0,80	0,0852	0,0148	0,0056
9	I. 0,0326 II. 0,0328 } 0,0337	0,0063	1,53	0,0842	0,0158	0,0010
12	I. 0,0332 II. 0,0323 } 0,0327	0,0073	2,69	0,0817	0,0182	0,0024
15	I. 0,0319 II. 0,0316 } 0,0317	0,0083	3,73	0,0792	0,0208	0,0026
19	I. 0,0313 II. 0,0319 } 0,0316	0,0084	4,78	0,0790	0,0210	0,0002
24	I. 0,0304 II. 0,0305 } 0,0304	0,0096	5,25	0,0760	0,0240	0,0030
30	I. 0,0312 II. 0,0301 } 0,0306	0,0094	6,03	0,0765	0,0235	0,000
36	I. 0,0307 II. 0,304 } 0,304	0,0096	6,60	0,0760	0,0240	0,000

Aus den Resultaten der Tabelle ist ersichtlich, daß der Hauptverbrauch des Ammoniak-Stickstoffs in die Zeit des Hefewachstums fällt, wie das zu erwarten war. Dann tritt ein Stillstand für einige Zeit ein, worauf eine neue Periode der Stickstoffentnahme aus der Lösung eintritt. In etwas unregelmäßiger Weise zeigt sich dann, daß der Stickstoffverbrauch bis zum Ende der Gärung fortschreitet.

Das Hauptresultat ist also jedenfalls, daß auch noch nach der abgeschlossenen Zellvermehrung noch Stickstoff von der Hefe aufgenommen wird, was sich an andersartigen Nährlösungen nicht verfolgen ließ, da sich der Stickstoffgehalt der Hefe nicht mehr vermehrt, sondern zum Ende der Gärung, wie vorher erörtert, sogar vermindert.

In einer stickstoffhaltigen Nährlösung ist also die Gärung dauernd von einem Stickstoffumsatz begleitet.

B. Bei einer Aussaatmenge, die Wachstum ausschließt.

Nachdem in mehreren Versuchsreihen bei verschiedenen Hefetypen gezeigt wurde, daß mit steigender Stickstoffkonzentration größere Stickstoffmengen durch die wachsende Hefe verbraucht werden, lag es nahe, die Frage auch bei einer Hefeaussaat zu prüfen, die Wachstum ausschloß. Man kommt so nach dem Vorbilde von A. Brown zu Resultaten, die nur die gärende Hefe mit Ausschluß der vegetativen betreffen. Hier sollte also geprüft werden, welchen Einfluß die Anwesenheit von Stickstoff in steigenden Konzentrationen auf den Stickstoffumsatz gärender Hefe hat. Um aber die Resultate noch vielfältiger zu machen, sollten verschiedene Hefen in den Bereich der Untersuchung gezogen werden. Es kam aber der Natur der Sache nach weniger auf die Wirkung verschiedener Hefetypen als vielmehr auf die verschieden stickstoffreicher Hefe an. Deshalb wurden zuerst zwei Preßhefesorten verwandt, die die Preßhefefabrik Hellbig in Wandsbeck gütigst zur Verfügung stellte. Die eine war nach dem Luftverfahren gewonnen und naturgemäß stickstoffärmer als die andere nach dem Wiener Verfahren durch Abschöpfen erhaltene.

Hier muß zuerst eine Bemerkung über die Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Hefe Platz finden, die, so viel ich sehen konnte, in der Literatur merkwürdigerweise nicht berücksichtigt ist. Handelt es sich um den Vergleich des Stickstoffgehaltes zweier Hefen, so wird immer nur von Stickstoffgehalt der Trockensubstanz gesprochen. Wurde dieser ermittelt, so lagen die Werte für die Lufthefe mit 6,75% und Wiener Hefe mit 7,38% nahe beieinander. Wurden diese Hefen nun mit Wasser aufgeschwemmt und in je 25 ccm der Aufschwemmung der Stickstoff bestimmt, so fand man in drei Parallelbestimmungen für Wienerhefe 0,0477 g Stickstoff und für Lufthefe 1. 0,0514, 2. 0,0515, 3. 0,0519 mit einem Durchschnitt von 0,0516 g Stickstoff. Bei Ermittlung der Zellenzahl zeigte sich, daß die Lufthefe 2028 Zellen pro $^1/_{4000}$ cmm, die Wiener Hefe jedoch nur 904 Zellen für dieselbe Volumeneinheit enthielt. Berechnet man daraus den Stickstoffgehalt einer Billion Zellen, so erhält man für die Wiener 0,527 g und für die Lufthefe 0,254 g Stickstoff für diese Zellenzahl.

Während also der Stickstoffgehalt der Trockensubstanz der beiden Hefen nur verhältnismäßig wenig differierte, war ihr wahrer

Stickstoffgehalt doch außerordentlich verschieden hoch. Die Wiener Hefe enthielt pro Zelle etwa die doppelte Menge Stickstoff als die Lufthefe.

Der wahre Stickstoffgehalt der Hefezellen läßt sich daher nur durch den Vergleich mit der Zellenzahl angeben. Ich mache den Vorschlag eine Billion Zellen als Normalmenge anzunehmen, da schon da die Werte für den Stickstoffgehalt sehr niedrig werden. Auch dabei kommt man um die Schwierigkeit nicht herum, den Stickstoffgehalt auf verschieden große Hefezellen beziehen zu müssen. Doch gelangt man, wie die Resultate zeigen werden, zu einer viel klareren Kenntnis vom wahren Stickstoffgehalt der Zellen unabhängig von der größeren oder geringeren Menge des Zellwassers, die sehr schwanken kann. Es braucht kaum erwähnt zu werden, daß auf andere Weise der Stickstoffgehalt der Hefezellen nicht zu ermitteln ist. Wie sollte man den Moment festhalten, wo das unabgepreßte Wasser verdampft ist und das Zellwasser der Hefe noch festgehalten wird?

Mit diesen beiden Hefen wurden drei Versuchsreihen angestellt. Die Hefeaufschwemmungen der Wiener- und der Luft-Hefe wurden nun so verdünnt, daß 50 ccm genau 0,04 g Stickstoff enthielten. Je 50 ccm dieser wurden nun zu 200 ccm der zu vergärenden Nährlösungen gebracht und dadurch durch die Verdünnung von 200 auf 250 ccm Werte für den Gehalt an schwefelsauren Ammoniak und 15 % Zucker erhalten, wie das aus den folgenden Tabellen hervorgeht. Die Zahl der ausgesäten Zellen berechnet sich dann 75,8 Zellen für die Wiener und 157,1 Zellen für die Lufthefe pro $^1/_{4000}$ cmm. Für die dritte Versuchsreihe wurde eine Verdünnung der Lufthefeaufschwemmung auf die Hälfte unternommen. Dadurch kam der Wert der ausgesäten Zellenzahl auf 78,5 für $^1/_{4000}$ cmm, also fast gleich dem Wert der Wiener Hefe. Gleichzeitig erniedrigt sich der Stickstoffgehalt der ausgesäten Hefe auf die Hälfte. Als der Sicherheit wegen dieser Wert nochmals in drei Parallelanalysen bestimmt wurde, ergaben sich die Werte I. 0,02016, II. 0,01988, III. 0,01974. Auf diese Weise wurde zugleich eine Bestätigung für die Richtigkeit der ersten Verdünnung gewonnen, da die Hälfte des beabsichtigten Stickstoffgehalts von 0,04 g den gefundenen Analysenzahlen genau entsprochen hatte. Die dritte Versuchsreihe gewährt so einmal einen Vergleich fast genau derselben Zellenzahlen der beiden Hefen und einen andern zwischen

der ganzen Stickstoffmenge der Lufthefe von 0,04 und der halben von 0,02 g Stickstoff pro 250 ccm.

Die stickstoffreiche Wiener Hefe wurde sechs, die stickstoffarme Lufthefe sieben und die Lufthefe mit geringerer Zellenzahl neun Tage mit der Zuckerlösung in Berührung gelassen. Dann wurde unter Zusatz einer geringen Menge stickstofffreien Kieselguhrs filtriert, wobei ein völlig klares Filtrat erhalten wurde. Die Hefe wurde zusammen mit dem stickstofffreien Filter sofort nach Kjeldahl verbrannt. Den Lösungen wurden nach dem Auffüllen auf 500 ccm durch Waschwasser und reines Wasser, ein für jede Konzentration für die Analyse geeigneter Teil entnommen und bald mit Magnesia usta destilliert, um nicht etwa neuen Zellen Gelegenheit zur Entwicklung zu geben. Für jede Konzentration waren drei Versuche angestellt worden, aus deren guter Übereinstimmung die Richtigkeit der Analysen folgt. Es darf jedoch nicht verschwiegen werden, daß sich bei allen drei Versuchsreihen eine geringe Menge Kahm entwickelt hatte. Trotzdem dies kaum einen durch die Analyse faßbaren Einfluß gehabt haben dürfte, wie besonders auch aus der guten Übereinstimmung der Resultate hervorgeht, so wurde später noch eine weitere Versuchsreihe mit Reinhefe angestellt, da sich mit Preßhefe die Kahmentwicklung nur mit großer Schwierigkeit hätte ausschliessen lassen. (Vergl. die Tabellen Seite 207 bis 209.)

Vergleicht man die Resultate der drei Versuchsreihen, die genau wie die früher erhaltenen berechnet wurden, so zeigt sich zuerst Stickstoffabgabe der Hefe an die Nährlösung in allen Fällen. Auf den ersten Blick sieht man, daß die Stickstoffabgabe der Hefe an die Lösung durch die Anwesenheit assimilierbaren Stickstoffs außerordentlich begünstigt wird. Während bei Abwesenheit von Stickstoff in der Lösung die Hefe einen geringen Teil ihres Stickstoffs verlor und nach der Gärung stickstoffärmer ist als vorher, reichert sich die Hefe in Gegenwart von Stickstoff in der Lösung mit Stickstoff an, und zwar mit wachsendem Stickstoffgehalt der Lösung in zunehmendem Maße. Für diesen Einfluß ist aber mit 0,1 g Stickstoff pro 250 ccm das Maximum erreicht. Der Wert für die höhere Konzentration 0,16 g Stickstoff liegt in allen drei Fällen dem für 0,1 g Stickstoff gefundenen innerhalb der Versuchs-

Stickstoffumsatz von Preßhefe (Wiener Verfahren)
vor und nach der Vergärung von 15 % Zucker. 250 ccm Lösung.

6 Tage Vergärungszeit					
vor		nach			
g Stickstoff der Hefeaussaat	g Stickstoff der Lösung als $(NH_4)_2SO_4$	g Stickstoff der Hefe	g Stickstoff der Lösung als NH_3	g Stickstoff als NH_3-Verbrauch	g Stickstoff aus der Hefe an die Lösung abgegeben
bestimmt	bestimmt	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet
0,04	0,00	I. 0,0357 II. 0,0354 III. — } 0,0355	0,00	—	0,0045
0,04	0,0402	I. 0,0420 II. 0,0412 III. 0,0396 } 0,0409	II. 0,0155 III. 0,0171 } 0,0163	0,0239	0,0230
0,04	I. 0,0996 II. 0,0996 } 0,0996	I. 0,0447 II. 0,0451 III. 0,0451 } 0,0450	I. 0,0745 II. 0,0708 III. 0,0695 } 0,0716	0,0280	0,0230
0,04	I. 0,1590 II. 0,1588 } 0,1589	I. 0,0469 II. 0,0448 III. 0,0440 } 0,0452	I. 0,1262 II. 0,1250 III. 0,1316 } 0,1276	0,0313	0,0261

Stickstoffumsatz von Preßhefe (Luft-Verfahren) vor und nach der Vergärung von 15 % Zucker. 250 ccm Lösung.

7 Tage Vergärungszeit					
vor		nach			
g Stickstoff der Hefeaussaat	g Stickstoff der Lösung als $(NH_4)_2SO_4$	g Stickstoff der Hefe	g Stickstoff der Lösung als NH_3	g Stickstoff als NH_3-Verbrauch	g Stickstoff aus der Hefe an die Lösung abgegeben
bestimmt	bestimmt	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet
0,04	0,00	I. 0,0344 II. 0,0328 } 0,0336	0,00	—	0,0064
0,04	0,0402	I. 0,0491 II. 0,0512 } 0,0501	I. 0,0078 II. 0,0084 } 0,0081	0,0321	0,0220
0,04	I. 0,0996 II. 0,0996 } 0,0996	I. 0,0563 II. 0,0525 III. 0,0536 } 0,0541	I. 0,0606 II. 0,0678 III. 0,0652 } 0,0645	0,0351	0,0210
0,04	I. 0,1590 II. 0,1588 } 0,1589	I. 0,0542 II. 0,0532 } 0,0537	I. 0,1321 II. 0,1302 III. 0,1302 } 0,1308	0,0281	0,0144

Sticksstoffumsatz von Preßhefe (Luft-Verfahren)
vor und nach der Vergärung von 15 % Zucker. 250 ccm Lösung.

9 Tage Vergärungszeit					
vor		nach			
g Stickstoff der Hefeaussaat	g Stickstoff der Lösung (als $(NH_4)_2SO_4$)	g Stickstoff der Hefe	g Stickstoff der Lösung als NH_3	g Stickstoff als NH_3-Verbrauch	g Stickstoff aus der Hefe an die Lösung abgegeben
bestimmt	bestimmt	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet
I. 0,0202 II. 0,0192 III. 0,0198 } 0,0197	0,00	I. 0,0150 II. 0,0152 } 0,0151	0,00	—	0,0046
0,0197	0,0402	I. 0,0280 II. 0,0279 III. 0,0295 } 0,0285	I. 0,0161 II. 0,0164 III. 0,0165 } 0,0163	0,0239	0,0151
0,0197	I. 0,0996 II. 0,0996 } 0,0996	I. 0,0301 II. 0,0327 III. 0,0301 } 0,0309	I. 0,0739 II. 0,0728 III. 0,0734 } 0,0734	0,0262	0,0150
0,0197	I. 0,1590 II. 0,1588 } 0,1589	I. 0,0333 II. 0,0301 } 0,0317	I. 0,1302 II. 0,1293 } 0,1297	0,0292	0,0172
0,0788	0,1589	0,0932	I. 0,1069	0,0520	0,0376

fehler nahe. Weiterhin zeigt sich, daß die stickstoffarme Hefe ihren Stickstoffgehalt während der Gärung stärker erhöht als die stickstoffreichere Hefe, wie das zu erwarten war. Denn der maximale Gewinn der Hefe an Stickstoff beträgt für die Wiener nur 0,0052 g, für die Lufthefe 0,0141 g. Schließlich zeigt sich eine Begünstigung der Stickstoffaufnahme bei geringerer Hefezahl. Die Lufthefe mit 0,02 g Aussaat hatte ihren Stickstoffgehalt während der Gärung maximal um 0,0120 g erhöht, die Lufthefe mit 0,04 g Stickstoff um 0,0141 g. Für die Einheit der Zahl war die geringe Hefezahl also stickstoffreicher geworden.

Der Verbrauch des Ammoniakstickstoffs und der Austritt von Stickstoff aus der Hefe während der Gärung stieg in zwei Versuchsreihen mit wachsender Stickstoffkonzentration an, während in der dritten bei der Lufthefe mit höherem Stickstoffgehalt der Aussaat eine Abnahme bei der höchsten Konzentration zu verzeichnen war. Das Resultat der beiden Versuchsreihen entspricht dem aus der Stickstoffanreicherung der Hefe mit steigender Stickstoffkonzentration der Lösung zu erwartenden. Es steht aber in krassem Widerspruch zu dem einen Resultat der dritten Reihe, zumal die Ergebnisse für dieselbe Hefe verschieden sind. Die Stickstoffausgabe der Hefe folgt durch Berechnung aus dem Stickstoffgewinn und dem Ammoniakstickstoffverbrauch. Man müßte also die Möglichkeit von Analysenfehlern für den einen Stickstoffverbrauch in Betracht ziehen, wenn die Übereinstimmung der Resultate eine weniger gute wäre. So muß von einer Verallgemeinerung über den Stickstoffverbrauch und den Stickstoffaustritt mit steigender Stickstoffkonzentration abgesehen werden, bis durch eine neue Bestätigung der erstgenannten übereinstimmenden Versuchsreihen erwiesen war, daß irgend welche unberechenbaren Einflüsse für den Ausfall der dritten Reihe verantwortlich waren. Um noch größere Sicherheit zu gewinnen, wurde deshalb in der folgenden Versuchsreihe mit der Konzentration des Ammoniakstickstoffs der Lösung noch höher hinaufgegangen.

Zur Vermeidung einer Verunreinigung durch Kahm wurde die für die neue Versuchsreihe zu verwendende Hefe selbst herangezüchtet. Zu diesem Zwecke wurde eine Bierwürze auf etwa ihr fünffaches Volumen verdünnt und zweimal nach der Sterelisation im Autoclaven von niedergeschlagenem Eiweißstoffen befreit, bis sie nach der dritten Sterelisation völlig klar blieb. Nachdem dadurch

und durch die Verdünnung einem weiteren Ausfallen von stickstoffhaltigen Körpern durch den bei der Gärung sich bildenden Alkohol vorgebeugt war, wurde mit Logos-Hefe beimpft. Nachdem sich in den zur Heranzucht verwandten 8 Liter-Flaschen ein reichlicher Hefesatz abgesetzt hatte, doch noch ehe die Hefe etwa durch die Vergärung der Würze erschöpft war, also nach sechs Tagen, wurde der Hefesatz von der Flüssigkeit getrennt und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. In der Hefeaufschwemmung wurde zuerst der Stickstoffgehalt von 50 ccm bestimmt und dieser dann wieder durch Verdünnen auf den gewünschten Wert von annähernd 0,025 g gebracht. Drei Parallelbestimmungen, wie sie die folgende Tabelle zeigt, gaben dann das gewünschte Resultat des mit der Hefe ausgesäten Stickstoffs.

Die wie früher angegeben vorbereiteten Gärflaschen wurden zur Vergärung sechs Tage bei 23° stehen gelassen. Am Ende des Versuches waren sie rein geblieben. (Vergl. Tab. S. 212.)

Das Resultat enspricht dem der vorstehenden Versuchsreihen. Der Stickstoffgehalt der Hefe steigt mit wachsender Stickstoffkonzentration der Lösung. Ebenso wächst der Verbrauch des Ammoniakstickstoffs und der Austritt des Stickstoffs aus der Hefe. Wie in den früheren Versuchen nimmt der Austritt des Stickstoffs aus der Hefe von keiner Stickstoffgabe der Lösung zur schwächsten sprungweise zu und steigt dann allmählicher an. Auch die Tatsache, daß die Hefe ihren Stickstoffgehalt mit wachsender Konzentration der Lösung nicht über ein Maximum erhöht, findet hier eine Wiederholung, denn die Resultate für den Stickstoffgehalt der Hefe liegen bei den drei höchsten Konzentrationen genau bei einander.

Dagegen tritt bei der neuen Versuchsreihe eine Neuerung in Bezug auf den Stickstoffgehalt der Hefe auf. Während sich bei früheren Versuchsreihen die Hefe während der Gärung in Gegenwart von assimilierbarem Stickstoff mit solchem angereichert hatte, ist in der letzten Versuchsreihe der Hefestickstoff in allen Fällen, auch dem des Maximums, niedriger, als der der Aussat. Hier findet sich also zum erstenmale eine Analogie mit dem Resultat von Duclaux[1]) für die große Aussaat nicht wachsender, gärender Hefe in einer Flüssigkeit, die Ammoniakstickstoffe enthielt. Hier

---

[1]) Traité de Microbiologie. 3, 209.

Stickstoffumsatz von Logos-Hefe
vor und nach der Vergärung von 15 % Zucker. 250 ccm Lösung.

6 Tage Gärzeit					
vor		nach			
g Stickstoff der Hefe	g Stickstoff als $(NH_4)_2 SO_4$	g Stickstoff der Hefe	Rest-Stickstoff als Ammoniak-Stickstoff	Stickstoff-Verbrauch	Stickstoff aus der Hefe an die Lösung abgegeben
I. 0,0256 II. 0,0263 III. 0,0263 } 0,0261	0,0	I. 0,0192 II. 0,0199 } 0,0195	0,0	0,0	0,0066
0,0261	I. 0,0420 II. 0,0422 } 0,0421	I. 0,0210 II. 0,0199 III. 0,0197 } 0,0202	I. 0,0301 II. 0,0301 III. 0,0302 } 0,0301	0,0120	0,0179
0,0261	0,0842	I. 0,0226 II. 0,0224 III. 0,0237 } 0,0229	I. 0,0638 II. 0,0655 III. 0,0644 } 0,0646	0,0196	0,0228
0,0261	0,1684	I. 0,0245 II. 0,0255 III. 0,0263 } 0,0254	I. 0,1423 II. 0,1419 III. 0,1428 } 0,1423	0,0261	0,0268
0,0261	0,3368	I. 0,0255 II. 0,0256 III. 0,0248 } 0,0253	I. 0,3066 II. 0,3087 III. 0,3052 } 0,3068	0,0300	0,0308
0,0261	0,6736	I. 0,0251 II. 0,0249 III. 0,0256 } 0,0252	I. 0,6342 II. 0,6566 III. 0,6412 } 0,6440	0,0296	0,0305

findet Duclauxs Angabe, daß die Flüssigkeit auch in einem solchen Falle nach der Gärung stickstoffreicher sein kann als vorher, eine Bestätigung. Wie jedoch aus den Resultaten der anderen drei Versuchsreihen hervorgeht, darf man diese Beobachtung auch für den speziellen Fall nicht verallgemeinern. Es kommt dabei ganz auf die Art der verwandten Hefe, d. h. auf ihre ursprüngliche Wachstumsgelegenheit an. Je ärmer die Hefe an Stickstoff war, desto mehr ist sie bestrebt, ihren Stickstoffgehalt auch ohne Wachstum während der Gärung zu vergrößern. Die Lufthefe tut das mehr als die Wiener Hefe und die in Würze herangezogene Hefe wird dabei doch stickstoffärmer. Denn diese Hefe enthielt 72,5 Zellen pro $^1/_{4000}$ cmm oder 290 Millionen pro ccm, 50 ccm mit 0,0261 g Stickstoff enthalten also 14,5 Milliarden Zellen oder eine Billion 1,80 g Stickstoff. Die in Würze herangezogene Hefe ist daher viel stickstoffreicher als die Wiener mit 0,527 g und die Lufthefe mit 0,254 g pro Billion Zellen. Dadurch erklärt sich ihr vorher geschildertes Verhalten.

Aus den angegebenen Beobachtungen kommt man auch zu einem besseren Verständnis des Ehrlichschen Befundes, daß sich stickstoffarme Hefen besser zur Spaltung racemischer Aminosäuren eignen als stickstoffreiche[1]). Denn stickstoffarme Hefen entnehmen der Gärflüssigkeit mehr assimilierbaren Stickstoff als stickstoffreiche. Dagegen kann ich mich mit der Ehrlichschen Stickstoffbilanz[2]), auf Grund deren man nach der Vergärung einer Leucinhaltigen Flüssigkeit in der Lösung eine den gebildeten Amylalkohol entsprechende Stickstoffmenge nicht wiederfinden soll, weniger befreunden. Diese, überdies nicht durch Analysenzahlen belegte, Bilanz kann nach meinen Beobachtungen über den Austritt des Stickstoffs aus der Hefe während der Gärung nicht stimmen.

Zusammenfassend bestätigt also die neue Versuchsreihe die Resultate der drei früheren über die Beeinflussung der Stickstoffernte der Hefe in gärenden Flüssigkeiten mit großer Aussaat. Die Stickstoffernte nimmt mit wachsender Stickstoffkonzentration der Lösung zu.

---

[1]) Biochemische Ztschr. **1**, 19. 1906.

[2]) Chemische Vorgänge bei der Hefegärung. Biochemische Ztschr. **2**, 76. 1906.

Weiterhin herrscht zwischen der neuen Versuchsreihe und zwei der früheren Übereinstimmung für den Stickstoffverbrauch der Hefe und den Austritt des Stickstoffs während der Gärung. Mit wachsender Stickstoffkonzentration wachsen auch diese beiden Faktoren. In der neuen Versuchsreihe kommt das noch deutlicher zum Ausdruck, weil mit der Stickstoffkonzentration der Lösung noch höher heraufgegangen wurde. Alle Wahrscheinlichkeit deutet daher darauf hin, daß der Ausfall der einen Versuchsreihe, der sich auf den geringer gefundenen Stickstoffverbrauch während der Gärung gründete, ein durch Versuchsfehler verschuldetes gewesen sein muß. Man kommt daher zu dem Schluß, daß mit steigender Konzentration einer Lösung an Stickstoff auch gesteigerter Stickstoffumsatz, bestehend aus größerem Stickstoffverbrauch und größerer Stickstoffabgabe der Hefe an die Lösung die Folge ist.

In gewissem Sinne sind die Resultate der vier Reihen eine Bestätigung des von Iwanoff aufgestellten Satzes, daß bei der Vergärung reiner Zuckerlösungen kein Eiweißzerfall der Hefe stattfindet. Das sprungartige Ansteigen des Stickstoffaustritts aus der Hefe von der stickstofffreien zur stickstoffhaltigen Lösung deutet an, daß der Stickstoffumsatz durch den Gehalt der Lösung an Stickstoff sehr angeregt wird. Der geringe Verlust von Stickstoff der Hefe bei der Vergärung reiner Zuckerlösung ließe sich dann dadurch erklären, daß nicht der Eiweißstickstoff sondern nur der Nichteiweißstickstoff der Hefe die Zellen während der Gärung verlassen hat. Dieser wurde von Iwanoff im Höchstfalle seiner Resultate zu 14 % befunden. Bei meinen Versuchen berechnet sich der Stickstoffverlust der Hefe bei Vergärung des reinen Zuckers auf 11, 13 und 16 % für die Preßhefen und auf 25 % für die aus Würze herausgezogene Hefe, für die auch wie erinnerlich, bei Stickstoffgabe keine Zunahme an Stickstoff während der Gärung gefunden wurde. Die Übereinstimmung ist also, besonders in Anbetracht der geringen Gesamtwerte auf die sich die Berechnung bezieht, eine genügende und gestattet auch für meine Versuche den Schluß, daß bei der Vergärung reiner Zuckerlösung nur der Nichtproteinstickstoff die Hefezellen verlassen hat.

Wird jedoch der Wert des aus der Hefezelle austretenden Stickstoffs während der Gärung in Gegenwart assimilierbaren Stickstoffs ein halb bis ein Mal so groß wie der Stickstoffgehalt der Hefe selbst, dann muß die Frage in Erwägung gezogen werden, ob der so umgewandelte Ammoniakstickstoff den Umweg über das Hefeeiweiß genommen hat. Sie kann leider keine definitive Beantwortung finden; denn es muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die erhöhte Stickstoffkonzentration nur als Reiz auf die Hefezelle gewirkt hat, daß eine Umwandlung des Ammoniakstickstoffs nach dessen Übertritt in den Zellsaft stattgefunden hat, ohne daß dadurch direkt ein Einfluß auf die Bildung neuen Hefeeiweißes stattgefunden hat. So könnte sich gewissermaßen eine Vorbereitung zum Eiweißaufbau eingeleitet haben, die dann infolge zu reichlich gebotener Zwischenstufen, die nicht in ihrer ganzen Menge Eiweiß werden konnten, zum Stillstand gekommen war. Doch gehört diese Frage noch in das Gebiet der Spekulation, so sehr sie auch zum Nachdenken anregen mag.

Jedenfalls findet bei höheren Stickstoffgaben eine bedeutende Luxuskonsumption dieses durch die Hefe statt. Denn nachdem festgestellt wurde, daß Zellvermehrung sowohl wie Gärung, die man hier vom teleologischen Standpunkt aus als Beschaffungszweck des andere Organismen abwährenden Alkohols auffassen soll, ihr Optimum weit unter dem Maximum des Ammoniakverbrauchs durch die Hefezelle finden, so kann man das so reichliche Hineinziehen dieses in den Stoffwechsel der Hefe nur als Luxuskonsumption ansprechen. Eine Luxukonsumption ist der große Stickstoffverbrauch der Hefè in solchen Fällen um so mehr, als die Hefe das Übermaß dieses ihr so wertvollen Nährmaterials nicht wie viele höhere Pflanzen zu späterer Verwendung stapelt, sondern es in der Nährlösung entläßt. Man darf hier jedoch von keinem reinen Exkret sprechen.

Pfeffer[1]) spricht vom rein physiologischen Standpunkt aus von Exkreten und Sekreten. Sekrete bedeuten allgemein Ausscheidungen aus der Zelle, Exkrete dagegen nur solche Ausscheidungsprodukte, die keinen weiteren Nutzen bringen können. Die Begriffe Exkret und Sekret können, wie auch schon Pfeffer betont, häufig nicht scharf auseinander gehalten werden. In unserm

---

[1]) Pflanzenphysiologie **1**, 440. 1897.

Falle kann der aus der Hefezelle in die Lösung entlassene Stickstoff sicherlich zum Aufbau neuer Zellen dienen. In der anfänglichen Lebensperiode der Hefe wird er gewiß z. T. auch dazu herangezogen, später aber tritt das mehr und mehr zurück und jedenfalls dient nur ein Teil des sekreten Stickstoff, neue Zellen zum Aufbau ihrer Leibessubstanz, während der größte Teil exkretiert wird.

Der Stickstoffwechsel der Hefe bildet gewissermaßen eine Zwischenstufe zu dem der höheren Pflanzen und höheren Tieren. Während die höheren Planzen ihre Energie der im Lichte stattfindenden Kohlensäureassimilation im Chloroplasten verdanken und dabei befähigt sind die geringsten Stickstoffkonzentrationen ihres Nährbodens auszunützen, an sich zu reißen und in ihren lebenden Teilen völlig festzuhalten, schöpft das höhere Tier seine Energie nicht nur aus dem Zerfall der gebotenen Fette und Kohlenhydrat sondern auch der stickstoffhaltigen Eiweißsubstanzen. Hierbei findet ein dauernder Abbau des Eiweiß statt, der sich im gesunden, ausgewachsenen Lebewesen so vollzieht, daß das Individium im Stickstoffgleichgewicht ist, d. h. den aufgenommenen Eiweißstickstoff in seiner Gesamtheit im Harn ausscheidet[1]).

Die Hefe nun schöpft ihre Energie, wenigstens in dem Falle, in dem ihr nur die energetisch niedrig stehende Stickstoffquelle, nämlich das Ammonium Jon, geboten wird, nur aus der Vergärung des Zuckers. Die einzelne Zelle kann wohl im Stickstoffgleichgewicht stehen, die Gesamtheit der wachsenden Zellen nimmt jedoch an Stickstoff zu, wie der Körper einer wachsenden höheren Pflanze. Die einzelne Zelle verhält sich ähnlich wie ein höheres Tier insofern sie bei konstantem Stickstoffgehalt ein Stickstoffwechsel unterhält. Mit diesem hat sie das gemeinsame, daß sie mit vermehrter Stickstoffzufuhr wachsende Mengen Stickstoff in die Lösung entläßt, wie ein Tierkörper bei vermehrter Eiweißzufuhr nie mehr als ein Maximum des Stickstoffs an sich halten kann und mit größeren Eiweißgaben auch zu größerer Ausscheidung von Stickstoff im Harn gezwungen wird[1]).

Daß der Stoffwechsel der Hefe eine Mittelstellung zwischen dem der höheren Pflanzen und höheren Tiere einnimmt, geht noch be-

---

[1]) Vergleiche hierzu: Tigerstedt, Lehrbuch der Physiologie des Menschen 1905. Viertes Kapitel.

sonders daraus hervor, daß sie sich letzteren in der Ausnutzung der Nährsubstrate nähern kann, weil sie auch aus der Stickstoffquelle Energie zu schöpfen imstande ist, wenn diese nämlich in höher molekularer Form als im Ammonium Jon z. B. als Aminosäure geboten wird. Das geht deutlich aus der Spaltung hervor, die Hefe mit Leucin vornimmt, das sie in Amylalkohol verwandelt. Denn diese Umwandlung ist mit Energiegewinn verbunden.

So kann man also die Betrachtung dahin zusammenfassen, daß Hefe in der Ausnutzung der Nährsubstrate zwischen höheren Pflanzen und höheren Tieren steht, sich letzteren aber durch die Ausscheidung eines Teiles des Stickstoffs und die Möglichkeit des Energiegewinns aus Stickstoffmaterial mehr nähert.

Anhang.

Der Einfluß der Zuckerkonzentration auf den Gärverlauf.

Im Anschluß an die Versuche über die Gärwirkung mit verschiedener Stickstoffkonzentration wurde auch die Wirkung verschiedener Zuckerkonzentration auf den Gärverlauf in das Bereich der Untersuchung gezogen. Zu diesem Zwecke wurde eine Würze mit etwa 153 g Zucker pro Liter benutzt. 25, 50 und 75 g Zucker wurden mit dieser Würze auf 250 ccm aufgefüllt und nach dem Beimpfen mit Logos-Hefe bei derselben Temperatur von 23° C wie die ursprüngliche Würze vergoren. Das Resultat auf 1 Liter Lösung umgerechnet findet sich in der folgenden Tabelle, deren Resultate dann weiterhin in ein Koordinatensystem (vergleiche Seite 185) übertragen wurden. Die Gärungen wurden unterbrochen, nachdem die mit Zucker versetzten zum selben Vergärungsgrad d. h. einem Gewichtsverlust von etwa 74 g CO_2 pro Liter, den die unveränderte Würze erreichen konnte, gekommen waren. Es zeigte sich, daß der genannte Gewichtsverlauf bei 200 und 300 g Zuckerzusatz etwa zur gleichen Zeit d. h. schon am 5. Tage und schneller als bei Zusatz von 100 g Zucker erreicht war. Hier dauerte das 8 Tage und mit unveränderter Würze noch bedeutend länger, nämlich 23 Tage. Man kann also das langsame Zuendekommen der Vergärung der ursprünglichen Würze nicht der hindernden Wirkung des Alkohols zuschreiben, sondern muß den Zuckermangel dafür verantwortlich machen. Dagegen nahm die Intensität der Angärung, die bei Zusatz von 100 g Zucker die der reinen Würze

stark übertraf, von 100 g Zucker zu 200 g und von 200 g zu 300 g ab. Die Entwicklung der Zellen muß sich also wohl bei 253 g Zucker pro Liter am günstigsten gestaltet haben, günstiger als mit 153 g, wogegen sie durch höheren Zuckerzusatz wachsende Hinderung erfahren haben muß.

Die Resultate lassen sich dahin summieren, daß Zellvermehrung bei 25% Zucker für Würze am günstigsten ist, daß aber ein schneller Gärverlauf durch noch höhere Zuckerkonzentration bis zu 45% erreicht wird. Hier findet also die bei Acetondauerhefe gemachte Beobachtung eine Bestätigung, die dafür verantwortlich sein muß, daß man bei solcher Hefe zur Erreichung eines hohen Vergärungsgrades mit so hohen Zuckerkonzentrationen wie 40% arbeitet.

Gärverlauf in g CO_2 per Liter bei verschiedener Zuckerkonzentration.

Würze beimpft mit Logos-Hefe.

Anzahl der Tage	Zuckerzusatz pro 1 Würze	— g	100 g	200 g	300 g
0					
1		17,2	24,8	10,0	2,4
2		28,4	48,4	36,0	16,4
3		34,8	56,4	49,2	39,6
4		.	64,8	68,0	65,6
5		45,2	67,6	74,4	73,6
6		46,2	70,0		
7		49,2	72,4		
8		52,8	74,4		
9		56,8			
10		60,0			
11		62,4			
12		.			
13		66,0			
14		67,2			
15		68,4			
16		69,6			
17					
18					
19					
20					
21		völlige			
22		Vergärung			
23		73,6			

Der Einfluß der Lüftung auf die Gärwirkung der Hefe.

Gelegentlich eines Versuches über die Bildung von Fuselöl zu verschiedenen Zeiten der Gärung, der an anderer Stelle berücksichtigt werden wird, stellte sich heraus, daß der Alkoholgehalt einer Würze an einem bestimmten Tage verschieden hoch war, je nachdem man die Gärung in offener Gärflasche oder unter einem Gärverschluß unternommen hatte. Der Grund für diese Erscheinung muß ohne Frage in der hemmenden Wirkung der CO_2 auf den Gärverlauf gefunden werden. Die Hinderung des Entweichens der Kohlensäure durch den Gärverschluß ist nur eine Abschwächung der Versuchsanstellung von Prandtl[1]), der im zugeschmolzenen Rohr arbeitete und von Foth[2]), der einen Überdruck von einer halben Atmosphäre auf die gärende Flüssigkeit wirken ließ. Auch Hansen[3]) und Ortloff[4]) fanden, daß gesteigerter CO_2-Gehalt der Flüssigkeit den Gesamteffekt der Gärung hindert.

Immerhin ist bemerkenswert, daß eine so geringe Verzögerung des Entweichens der Kohlensäure, wie sie ein Gärverschluß im Vergleich zu einer mit Watte verschlossenen Gärflasche, die nicht bewegt wird, bietet, schon einen so merkbaren Unterschied im Gärverlauf zur Folge hat; die folgende Tabelle enthält die mit 250 ccm Würze gewonnenen auf 1 Liter umgerechneten Resultate der Alkoholbestimmungen. Aus den 250 ccm Lösung wurden 150 ccm abgedampft und der Alkoholgehalt bei 15° C mit demselben Pyknometer unter möglichster Innehaltung der Temperatur ermittelt. Die Impfung geschah mit einer Öse Logos-Hefe, die frisch vorbereitet und 48 Stunden alt war. (Vergl. Tab. Seite 220.)

Wie man sieht, ist der Unterschied im Gärverlauf zwischen Watte- oder Gärverschluß ein ganz bedeutender. Die Vergärung ist unter Watte schneller. Am 4. Tag ist die Differenz im Alkoholgehalt zwischen den beiden Versuchsreihen am größten, um dann bei zunehmender Zeit allmählich wieder abzunehmen. Dies findet im hemmenden Einfluß des Alkohols seine Erklärung, der vom 4. Tag bei der Gärung unter Watte deutlich einsetzt.

---

[1]) Bayrische Bierbrauer. **1865**.

[2]) Wochenschr. f. Brauerei **1887**, 73.

[3]) Centralbl. f. Bakt. **1.** 1887. Ztschr. für das gesamte Brauwesen **1887**, 304.

[4]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **6**, 676. 1900.

Vergleich zwischen der Menge Alkohol, die unter Watteverschluß oder Gärverschluß an verschiedenen Tagen pro Liter Würze gebildet wurden.

Beimpft mit Logos-Hefe.

Anzahl der Tage	Unter Watteverschluß g	Unter Gärverschluß g	Differenz g
2	20,40	16,64	3,76
3	44,36	36,48	7,88
4	56,04	42,36	13,68
5	61,32	52,64	8,68
6	63,56	58,20	5,36
7	66,24	59,52	6,72
8	65,76	61,32	4,44

So zeigt der Versuch jedenfalls, daß man im Laboratorium unter Gärverschlüssen gewonnene Resultate nicht in ihrer ganzen Breite auf die Bedingungen offener Gärgefäße übertragen darf. Der Wert der Bestimmung eines Gärverlaufs durch Wägen des CO_2-Verlustes unter Gärverschlüssen wir dadurch nicht unbedeutend vermindert.

Schluß.

Wir stehen am Ende unserer Betrachtungen über den Einfluß des Stickstoffs in gärenden Flüssigkeiten auf verschiedene Lebensfunktionen der Hefe. Ob es uns gelungen ist, den roten Faden durch den verschlungenen Pfad der Einzelbetrachtungen zu winden, kann erst eine allgemeine Kritik entscheiden. Auf einem Gebiete, das schon von Pasteur als ein verworrenes angesprochen wurde, ist auch heut noch manches problematisch, vieles noch in das Dunkel gehüllt, welches alle Fragen der Lebensfunktionen, die das Eiweiß mit einbeziehen, umgibt. Die am Ende stehende Schlußbetrachtung, welche unsere Kenntnis über den Stickstoffeinfluß und Umsatz während der Gärung zusammenfaßt, wird jedoch, wie ich glaube, beweisen, daß wir über den Standpunkt Duclauxs (a. a. O. S. 215) hinausgekommen sind, den er am Ende seines Kapitels über die Stickstoffernährung der Hefe in folgende Worte kleidet: „Die physiologische und chemische Zusammensetzung einer Hefe sind also völlig verschieden. Nur die Gärkraft wächst nach Hayduck mit ihrem Reichtum an Stickstoff. Dies ist die einzige Beobachtung, die inmitten all dieser so schwer faßlichen Variationen

unveränderlich besteht, die den Gegenstand einer Menge von Veröffentlichungen gebildet haben, unter denen man eine Fülle von Widersprüchen aufdecken könnte, aber deren inneren Gehalt zu kondensieren man sich lieber versagen soll."

Zusammenfassung der Resultate des Teil II.

Die Hefe enthält Stickstoff (Kunkel). Die Zuckerspaltung ist von einem Verlust des Stickstoffs der Hefe begleitet (Thénard), wobei die Hefetrockensubstanz stickstoffärmer wird (Mitcherlich). Nach Liebig ist die Zuckerspaltung eine molekulare Bewegung, ausgelöst durch eine spontane Zersetzung der eiweißartigen Substanz, während Nägeli diese nur für die Folge der stattfindenden Gärung hält. Auch Pasteur hielt Eiweißumsetzung für die notwendige Begleiterscheinung der Gärung. Er beobachtete auch den Austritt des Stickstoffs aus der Hefe bei der bloßen Aufschwemmung mit Wasser.

Die Vermehrung der Hefe in gärender Maische ist bei Beginn der Hauptgärung beendet (Hayduck). Der Gehalt der Maische an löslichen stickstoffhaltigen Substanzen nimmt während der Gärung ab, Hefewachstum und Gärwirkung der Hefe stehen aber in durchaus keinem Verhältnis zu einander (Delbrück). Bei der Nachgärung findet wieder Zunahme an gelöstem Stickstoff statt (Delbrück). Die Hefe nimmt aus Würzen immer mehr Amidstickstoff als Proteïnstickstoff auf (Lintner). In wenig Stickstoff enthaltender Lösung entstehen Hefen von minimalem Stickstoffgehalt, deren Mengen dem Stickstoffgehalt der Lösung proportional sind. Bei höherem Stickstoffgehalt der Lösungen bleibt die Hefemenge konstant, während ihr Stickstoffgehalt wächst. Der in einer Lösung enthaltene Stickstoffgehalt wird nur bis zu einer gewissen Konzentration ganz von der Hefe ausgenutzt. Die Stickstoffausscheidung durch die Hefe nimmt mit steigendem Stickstoffgehalt der Nährlösung, mit der Dauer der Gärung und der Erhöhung der Gärtemperatur zu (Hayduck). Mit steigendem Stickstoffgehalt der Hefe findet eine Zunahme der Gärkraft statt (Hayduck).

Bei Steigerung der Zuckerkonzentration von 10 auf 20% findet gesteigerte Ausnutzung des Stickstoffs durch die Hefe, verbunden mit größerer Gärwirkung statt. (Bewiesen nur für das Ammoniak von Thomas, für das Asparagin von Stern.) Die Oberhefe verbraucht in einer Lösung, die Ammoniak- und Asparaginstickstoff enthält, unter sonst gleichen Bedingungen weniger

des ersteren als die Unterhefe (Petit). Auf derselben Würze geben verschiedene Heferassen große Schwankungen in der Hefeernte und deren Stickstoffgehalt (Boulanger). Die Lüftung begünstigt die Stickstoffaufnahme durch die Hefe (Boulanger, Hyde). Bei optimaler Temperatur wird bei gleichzeitiger Anwesenheit der Ammoniak-Stickstoff mehr als der organisch gebundene, bei höherer Temperatur der organisch gebundene mehr als der Ammoniak-Stickstoff ausgenutzt (Laborde). Die Hefeausbeute fällt vom Pepton als Stickstoffquelle zum Asparagin (Kusserow) und zum Ammonsulfat (Bokorny). Peptonzusatz beschleunigt den Gärverlauf eines Mostes außerordentlich (Behrens). Die Hefe verliert in sehr peptonreicher Lösung in Gegenwart nur geringer Zuckerkonzentration ihren Charakter als Gärungsorganismus, während ihre vegetabilische Lebenskraft sehr gesteigert wird (Iwanowski). Mit Hefewasser als Stickstoffquellen entfalten bei einer Konzentration von etwa 0,008 % Stickstoff verschiedene Hefen eine größere Gärwirkung als mit Pepton und Asparagin (Hess). Logos hat größere Gär- und Vermehrungsenergie als Hefe Saaz und Frohberg (Hess).

Bei der Vergärung reiner Zuckerlösungen macht sich in den ersten Tagen, ehe die Erschöpfung der Hefe eintritt, keine Eiweißzerspaltung bemerkbar. Die Gärung ist also nicht an einen Eiweißzerfall der Hefe gebunden. Während der Gärung bildet sich eine flüchtige Substanz, die den Eiweißzerfall hemmt (Iwanoff).

Meine eigenen Versuche gestatten folgende allgemeine Schlußfolgerungen. Die Gärwirkung wachsender Hefe steigt bei Pepton als Stickstoffquelle mit wachsender Stickstoffkonzentration. Bei Leucin, Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak verringert sich die Gärwirkung mit steigender Stickstoffkonzentration der Nährlösung von einem Minimum der Stickstoffgabe an, das offenbar für die Ernährung der Zellen nicht mehr ausreicht. Denn die bei diesem Minimum gebotene Stickstoffgabe wurde beim schwefelsauren Ammoniak, bei dem das ja nur bestimmt werden konnte, von der Hefe ganz verbraucht. Dieses Minimum der ausreichenden Stickstoffgabe und Maximum der Gärwirkung liegt beim Leucin, Asparagin und schwefelsauren Ammoniak nahe bei 0,008 % Stickstoff. Bei diesen drei Stickstoffquellen wird nicht nur die relative, sondern auch die absolute Intensität des Gärverlaufs ziemlich unabhängig von der Form der Stickstoffquelle.

Bei den drei genannten Stickstoffquellen findet bei allen drei Hefetypen ausgehend vom genannten Optimum mit zunehmender sowohl wie abfallender Stickstoffkonzentration der Lösung Abfall in der Intensität der Gärwirkung mit großer Regelmäßigkeit statt.

Bei der optimalen Stickstoffgabe der drei letztgenannten Stickstoffquellen wirkt Pepton viel schlechter als diese auf den Gärverlauf. Der höchste ökonomische Faktor, d. h. schnellster Gärverlauf mit geringster Stickstoffgabe, wird also nicht beim Pepton, sondern mit Asparagin erzielt.

Die Kombination verschiedener Stickstoffquellen ist im Vergleich zu einer auch bei gleichbleibender Stickstoffkonzentration weit günstiger auf die Gärwirkung. Auch in Kombination von Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak geben 0,008 % Stickstoff wieder maximale Gärwirkung von allen geprüften Kombinationen mit Ausschluß von Pepton.

Leucin wirkt mit steigender Konzentration hemmend auf die Gärwirkung abgetöteter Hefe.

Mit steigender Peptonkonzentration steigert sich auch die Zahl der geernteten Hefezellen analog der Steigerung der Gärwirkung. Bei Leucin, Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak fällt maximale Zahl der Hefeernte nicht mit höchster Stickstoffkonzentration zusammen. Bei allen drei Stickstoffquellen lag die günstigste Konzentration für Aufzucht der größten Hefezahl bei 0,0321 % Stickstoff. Da das Maximum für die Gärwirkung nahe bei 0,008 % also dem vierten Teil lag, so fällt Optimum der Gärwirkung und des Wachstums nicht zusammen.

Der Stickstoffgehalt der Hefeernte ist von der Konzentration der Lösung an Stickstoff ziemlich unabhängig, jedenfalls viel unabhängiger als der Stickstoffverbrauch der Hefe während der Gärung. Das findet seine Erklärung in dem Austritt von Stickstoff aus der Hefe während der Gärung, der deshalb bei der Bestimmung des Verbrauchs immer berücksichtigt werden muß. Dieser kann bei Wachstum minimaler Einsaat während der Gärung den Stickstoffgehalt der Hefe um ein mehrfaches übertreffen. Diese am Ammoniak als Stickstoffquelle gewonnenen Resultate sagen weiter aus, daß der Verbrauch des Ammoniaks und der Austritt von Stickstoff aus der Hefe mit wachsender Stickstoffkonzentration der Nährlösung zunimmt. 0,04 % Stickstoff wird bei Vergärung einer 15 %igen Zuckerlösung bei drei verschiedenen Hefetypen ganz ausgenutzt.

Da nun der Stickstoffverbrauch mit wachsender Konzentration weit über das Optimum der Gärwirkung hinaus zunimmt, so folgt daraus, daß zwischen Stickstoffverbrauch und Gärwirkung kein direktes Verhältnis besteht.

Eine gärende Hefe, die durch große Einsaat am Wachstum gehindert wird, verhält sich in den eben gegebenen Beziehungen ebenso wie eine aus minimaler Aussaat heranwachsende. Findet sie Stickstoff in der Lösung vor, so verbraucht sie mit wachsender Konzentration dieses mehr und entläßt auch mehr in die Lösung. Auch der Stickstoffgehalt der Hefeernte wächst mit steigender Konzentration der Lösung in solchem Falle. Dagegen kann der Erntestickstoff größer oder kleiner als der der Aussaat sein, je nachdem man stickstoffarme oder -reiche Hefe verwendet.

Bei der Vergärung reiner Zuckerlösungen ist bei großer Aussaat vor der Zeit der Hefeerschöpfung nur geringer Sticktoffaustritt aus der Hefe zu beobachten, sodaß man im Zusammenhang mit den Resultaten von Iwanoff annehmen kann, daß nur Nichteiweißstickstoff in die Lösung entlassen wurde. Dieser Austritt von Stickstoff aus der Hefe könnte z. T. abgestorbenen Zellen zugeschrieben werden. Dadurch mag sich auch erklären, daß die Werte für ausgetretenen Stickstoff etwas größer als die für Nichteiweißstickstoff der Hefe gefunden wurden. Bei den großen Mengen von Stickstoff jedoch, der die Zellen in Gegenwart von assimilierbarem Stickstoff der Lösung verläßt, muß die aus toten Zellen abgegebene Quantität verhältnismäßig äußerst gering sein.

Der Stickstoffgehalt einer Hefe ist nicht vom Stickstoffgehalt ihrer Trockensubstanz, sondern in hohem Grade auch von dem Prozentgehalt an Trockensubstanz oder Zellwasser abhängig. Man kann den wahren Stickstoffgehalt einer Hefe daher nur in Beziehung zu einer bestimmten Anzahl Hefezellen ermitteln, da man wasserfreie Hefe durch Trocknen nicht darzustellen imstande ist, ohne auch das Zellwasser zu verdampfen.

Der Stoffwechsel der Hefe steht in der Mitte zwischen dem der höheren Tiere und höheren Pflanzen. Die Hefe ist imstande, ihre Energie nur aus dem Zerfall der Kohlenstoffquelle zu schöpfen, wie die Pflanze nur Energie aus der Kohlensäureassimilation gewinnt. Die Hefe kann aber auch Energie aus der Spaltung der Stickstoffquelle gewinnen, wodurch sie sich den höheren Tieren nähert, die ihre Energie nicht nur aus Fetten und Kohlehydraten sondern auch aus sich abbauenden Eiweißsubstanzen beziehen.

Teil III.

Der Einfluß der Stickstoffernährung auf die Bildung der Nebenprodukte, speziell des Fuselöl, bei der alkoholischen Gärung.

Historische Einleitung.

Die Beobachtung, daß sich bei der alkoholischen Gärung Nebenprodukte bilden, ist schon älteren Datums. Diese Nebenprodukte sind bekanntlich verschiedener Art. Neben den schon von Pasteur beobachteten Glyzerin und Bernsteinsäure sind Fettsäuren, Ester, Aldehyde, zuweilen das Isobutylenglykol und vor allem die höheren Alkohole zu nennen. Das Interesse an dem Ursprung dieser Produkte ist dagegen jüngeren Datums. Es schien hier besonders wissenswert zu erfahren, ob die Nebenprodukte aus dem der Hefe gebotenen Zucker hervorgehen, ob sie anderen Urstoffen ihr Auftreten verdanken oder durch Nebengärungen gebildet werden? Der Wunsch diese Fragen zu lösen, war gerade für die höheren Alkohole, die hier wie allgemein üblich schlechthin Fuselöl genannt werden sollen, ein besonders brennender und zwar aus zwei Gründen. Erstens ist die stärkere oder schwächere Bildung dieser Produkte für die Gärungs-Industrie von Interesse, da diese flüchtigen Produkte, im Gegensatz zu den unter den normalen Verhältnissen der in der Praxis gehandhabten Destillation nicht flüchtigen, Glyzerin und Bernsteinsäure, die Qualität des gebildeten Alkohols, von dem sie nur schwer zu trennen sind, beeinflussen und deshalb die Unterdrückung der Fuselölbildung speziell für die Spiritus-Industrie von Wert wäre. Zweitens weil einerseits infolge der Verwendung besserer Methoden, vor allem durch die Einführung von Hefereinkulturen, ein Rückgang in der Fuselölproduktion zu verzeichnen war, andererseits aber die Nachfrage nach diesem Produkt, besonders dessen Hauptbestandteil, dem Amylalkohol durch die chemische Industrie wuchs. Denn der Amylalkohol findet in Form verschiedener Ester Verwendung als Fruchtessenz; in weit größeren Mengen aber wird das Amylacetat zur Gelatinisierung von Sprengstoffen verwandt, so daß bald

Mangel auf dem Weltmarkt eintrat, der mit großer Preissteigerung verbunden war.

Die verschiedenen Einflüsse, welche die Bildung von Glyzerin und Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung beeinflussen, sind infolge langbekannter Methoden zur Bestimmung dieser Körper, eingehend erforscht worden. Für das Fuselöl blieb das infolge Mangels einer geeigneten Methode aus.

Was über den Ursprung und die Zusammensetzung des Fuselöls vor Einsetzen meiner Arbeiten bekannt war, habe ich schon früher zusammengefaßt[1]). Ich habe damals hervorgehoben, daß die älteren Theorien über den Ursprung des Fuselöls noch sehr mangelhaft waren und besonders auf die große Übereinstimmung in der Zusammensetzung der aus verschiedenen Produkten gebildeten Fuselöle hingewiesen. Neben Amylalkohol und seltener auftretenden Alkoholen mit mehr Kohlenstoffatomen findet sich immer normaler Propylalkohol und Isobutylalkohol im Fuselöl.

Als ich mich vor mehr als drei Jahren mit der Frage nach dem Ursprung des Fuselöls zu beschäftigen anfing, erschien, ehe meine Untersuchungen zu einem Abschluß gelangt waren, eine Veröffentlichung von Emmerling[2]), der einen Fuselöl bildendes Bakterium isoliert haben wollte. Im Anschluß an den Titel dieser Publikation nannte ich eine kurze Mitteilung[3]), um mir das Recht zu weiterer Arbeit auf dem von mir bereits in Angriff genommenen Gebiet zu sichern: „Zur Fuselölfrage“. Daß aber in dieser Mitteilung ausgesprochen ist, daß ich Bakterien die Bildung von Fuselöl bei der Alhoholgärung zuschrieb, wie das neuerdings Ehrlich[4]) und Windisch[5]) angeben, muß ich bestreiten. Ich habe vielmehr, nach eingehender Kritik der früheren Theorien über den Ursprung des Fuselöls und genauem Studium der durch Bakterien gebildeten höheren Alkohole, bald darauf[6]) deutlich ausgesprochen, daß nach meinem Dafürhalten die Bildung höherer Alkohole bei der Hefegärung nicht auf die Mitwirkung von Bakte-

---

[1]) H. Pringsheim, Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 300. 1905.

[2]) O. Emmerling, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **38**, 3535. 1904.

[3]) H. Pringsheim, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **38**, 486. 1905.

[4]) F. Ehrlich, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 4072. 1906.

[5]) Karl Windisch, Die chemischen Vorgänge beim Werden des Weines. Stuttgart, Eugen Ulmer **1906**, 41.

[6]) H. Pringsheim, Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 300. 1905.

rien zurückzuführen sei. Besonders wurde von mir damals noch hervorgehoben, daß alle bekannten Bildner höherer Alkohole Buttersäurebakterien sind, und daß die Menge der durch sie gebildeten Buttersäure im Vergleich zur Menge der gebildeten Alkohole gar nicht dem Verhältnis dieser Produkte in allen bis jetzt untersuchten Fuselölen entspreche!

Besonders eingehend war meine Kritik der Angaben von Perdrix[1], der ein Amylalkohol bildendes Bakterium isoliert haben wollte. Ich legte damals klar, warum durch die Art der Perdrixschen Analyse kein Beweis geliefert sei, daß das Bakterium in der Tat Amylalkohol produziere. Dasselbe ließ sich von den Bakterien sagen, die Pereine und Guignard[2] zur Produktion eines fuselreichen Brennspiritus benützen wollten. Daß nun A. Bau, in seinem Aufsatz über den Chemismus der Alkoholgärung in Lafars Handbuch der technischen Mykologie[3], einem Buche, das von jetzt an für solche Fragen maßgebend sein sollte, alle meine Resultate unberücksichtigt läßt und von neuem, sowohl im Kapitel über die flüchtigen Nebenprodukte der alkoholischen Gärung wie im Anhang über die Alkoholbildung durch Bakterien, von dem besonderen Interesse spricht, daß diesen Amylalkohol bildenden Bakterien zukommt, ist bedauerlich. Bis jetzt ist noch kein Bakterium in das Bereich der exakten Forschung gesetzt worden, das Amylalkohol in mehr als Spuren zu bilden imstande wäre. Dies wird auch durch die Tatsache nicht erschüttert daß E. A. Mislin und A. Lewin ein drittes Bakterium von Pflaumen isoliert haben wollen, dessen Gebrauch sie sich zur technischen Beschaffung von Amylalkohol patentieren ließen[4]. Denn trotzdem eine mir von den genannten Herren auf meinen Wunsch übersandte Probe nach genauer Analyse, die nicht die Siedepunktbestimmung der Alkohole allein sondern auch die der ihnen korrespondierenden Jodide zur Grundlage hatte, der Zusammensetzung eines normalen Fuselöls entsprach, konnte keine Nachuntersuchung mit Hilfe des aus einer Reinkultur gebildeten Alkoholgemisches unternommen werden, da die genannten Herren die Überlassung einer

---

[1] Perdrix, Ann. de l'Institut Pasteur 5, 307. 1891.
[2] D. R.-P. 139387 vom 23. November 1901.
[3] 4, 371, speziell 402.
[4] Engl. Patent 10435 vom 31. Mai 1905.

Kultur aus praktischen Gründen ablehnten und jeden weiteren Verkehr abbrachen! —

Neuerdings gibt noch K. Windisch (a. a. O) an, daß er im Jahre 1901 drei Traubenmoste teils der spontanen Gärung, teils der Vergärung durch Hefereinkultur überließ und bei der Analyse des gebildeten Alkohols nach dem Röseschen Verfahren in ersterem Falle bedeutend höhere Fuselölmengen vorfand. Daraus schlußfolgert er wiederum, daß doch ein nicht unerheblicher Teil der höheren Alkohole auf Rechnung von Nebengärungen zu setzen ist. Dem können wir aufs neue entgegenhalten, daß jede Hinderung der freien Lebenstätigkeit der Hefe, wie sie doch auch durch die gleichzeitige Entwicklung von Fremdorganismen veranlaßt wird, die Bildung von Nebenprodukten der alkoholischen Gärung steigert, wie in der folgenden Arbeit noch deutlicher gezeigt werden wird.

Die Bildung höherer Alkohole aus Aminosäuren durch die Hefegärung.

Als meine Veröffentlichung, in der ich die allgemeine Anschauung über die Bildung des Fuselöls durch Bakterien bekämpfte, im Druck war, erschien eine grundlegende Arbeit von F. Ehrlich[1]) über die Entstehung des Fuselöls, in der nachgewiesen wurde, daß die Hefe bei der Gärung eine Überführung von Leucin in Amylalkohol bewirkt. Besonders beweiskräftig waren die Versuche, in denen Ehrlich zeigte, daß aus d-l-Leucin optisch inaktiver Isoamylalkohol, aus von ihm[2]) in Melasserückständen gefundenem d-l-Isoleucin jedoch linksdrehender d-Amylalkohol entstand, da bei der Umwandlung der Aminosäure in Alkohol das Leucin durch die Veränderung der -CH-Gruppe in eine CH_2-Gruppe sein einzig asymetrisches Kohlenstoffatom verlor, während bei dem zwei asymetrische Kohlenstoffatome enthaltenden Isoleucin eins als solches bestehen blieb. Ehrlich erreichte die Umwandlung der Leucine in Amylalkohole dadurch, daß er sie einer Zuckerlösung vergärenden Hefe vorsetzte. Er bediente sich

[1]) Felix Ehrlich, Ztschr. des Vereins für Rübenzuckerindustrie **55**, 539. 1905; Ztschr. f. Spiritusindustrie **1905**. Vergleiche auch die Besprechung dieser Arbeit durch Samuel P. Sadtler. The Chemical Engineer **8**, Nov. 1905. Nr. 1.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **37**, 1809. 1904.

zu diesem Zwecke großer Aussaaten fertig gebildeter Preßhefe. Es schien nun im Interesse der Gärungsphysiologie zu liegen, die wertvolle Beobachtung, welche hauptsächlich die chemische Seite des Problems gelöst hat, zu benutzen, um die Frage zu beantworten, welche Rolle die Fuselölbildung im Haushalt der Hefe, besonders in dem einer mit teilweiser Ausnutzung der Aminosäuren, aus denen Fuselöl gebildet wird, heranwachsenden Hefe spielt, wie das der in den meisten natürlichen Maischen und Würzen herrschende Fall sein wird.

Ehrlich erklärt die Bildung von Isobutylalkohol in analoger Weise wie die des Amylalkohol aus der Aminoisovaleriansäure. Besonders sei hier noch hervorgehoben, daß die Konstitution dieser schon von E. Schulze[1]) in pflanzlichen Stoffen neben Leucin beobachteten Säure neuerdings von E. Fischer und Dörpinghaus[2]) sichergestellt und als α-Aminoisovaleriansäure von der Formel $\frac{CH_3}{CH_3}{>}CH{\cdot}CH{\cdot}NH_2COOH$ erkannt wurde. Daß mit ihr wohl die anderen aus zahlreichen Eiweißspaltungsprodukten isolierten Aminovaleriansäuren übereinstimmen[3]), ist im Zusammenhang mit der Tatsache von Wichtigkeit, daß Fuselöl immer nur den Isobutyl- und nicht etwa normalen Butylalkohol enthält, wie ich früher so ausdrücklich hervorgehoben habe[4]).

Die Bildung des normalen Propylalkohols im Fuselöl will Ehrlich von der Glutaminsäure, die gerade Kette enthält, ableiten. In der Tat findet sich diese Säure nicht nur in pflanzlichen Eiweißstoffen, sondern nach Schenk[5]) auch unter den Selbstverdauungs-Produkten der Hefe. Ob man den Ursprung des n-Propylalkohols im Fuselöl mit besserem Recht nicht auf die in Eiweißspaltungsprodukten ja auch wahrscheinlich gemachte Aminobuttersäure[6]) zurückführen kann, wird Ehrlich gewiß durch das Experiment entscheiden. Jedenfalls fanden E. Abderhalden

---

[1]) E. Schulze, Ztschr. f. physiol. Chem. **15**, 300. 1901.

[2]) E. Fischer und Dörpinghaus, Ztschr. f. physiol. Chem. **36**, 469. 1902.

[3]) Die zahlreichen Arbeiten von E. Fischer, E. Abderhalden und deren Mitarbeitern in den letzten Jahrgängen d. Ztschr. f. physiol. Chem.

[4]) H. Pringsheim, Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 302. 1905.

[5]) Wochenschr. f. Brauerei **22**, 221 bis 227. 1905.

[6]) Ztschr. f. physiol. Chem. **39**, 70. 1902.

und seine Mitarbeiter im Vergleich zum Leucin so reichliche Mengen Glutaminsäure unter einer größeren Varietät gespaltener Eiweißkörper, wie das dem Verhältnis von Amylalkohol zum Propyl alkohol im Fuselöl nicht entspricht.

Hier muß auch hervorgehoben werden, daß die Einheitlichkeit in der Zusammensetzung der Fuselöle, von der ich früher sprach, auf eine Analogie in der Zusammensetzung der Eiweißspaltungsprodukte, aus denen sie hervorgehen, hindeutet, was ein neuer Beleg für die Spaltung von Eiweißkörpern verschiedener Herkunft in analoge Abbauprodukte ist.

Die Ziele der nachstehenden Untersuchung.

Nachdem so auf das sicherste erwiesen war, daß das Fuselöl, oder im speziellen die darin enthaltenen höheren Alkohole, durch die ausschließliche Wirkung der Hefe bei der Reinkulturgärung entstehen kann, eröffnete sich eine neue Perspektive für die Beurteilung der die Fuselölbildung beeinflussenden physiologischen Momente.

Hier muß von vornherein eine getrennte Fragestellung Platz greifen. Es kann sich bei der Fuselölbildung durch die Hefe ein Mal um die Überführung von ursprünglich in der Gärflüssigkeit vorhandener in Alkohole verwandelbaren Aminosäuren handeln. Andererseits kann aber auch der Fall eintreten, daß die Hefe in der Nährflüssigkeit keine solchen Stickstoffquellen findet, sondern erst während der Gärung durch ihren Stickstoffumsatz Aminosäuren in die Nährlösung entläßt, wie das im zweiten Teil der Arbeit erwogen wurde, und dann erst diese so gebildeten Ausscheidungsprodukte in höhere Alkohole umwandelt. Die erste Möglichkeit ist in allen technischen Gärmedien gegeben, die die stickstoffhaltigen Materialien in Form vorher gespaltener Eiweißkörper enthalten. Sie läßt sich in ihrer einfachsten Form durch eine künstliche Nährlösung nachahmen, die nur eine Aminosäure als Stickstoffquelle enthält, andere assimilierbare Stickstoffquellen aber ausschließt. Genauer den Verhältnissen der Praxis sich anschließend, ist der Fall der gleichzeitigen Anwesenheit der Aminosäure und anderer Stickstoffnährsubstrate, der die praktischen Bedingungen durch die genaue Kenntnis der qualitativen und quantitativen Verhältnisse der verwandten Stickstoffquellen in klarerer Form wiedergibt. — Die zweite Möglichkeit des völligen Aus-

schlusses von vorgebildeten Aminosäuren in der Gärflüssigkeit läßt sich durch künstliche Nährlösungen gut erreichen.

Um der Ergründung der Frage nach der Lebensfunktion der Hefe, welche die Überführung von Aminosäuren in höhere Alkohole zur Folge hat, näher zu treten, habe ich Versuche in den eben angedeuteten zwei Richtungen angestellt. Erstens untersuchte ich den Fall, daß präformierte Aminosäuren vorhanden sind. Zuerst wurde die Überführung von Leucin bei der Gärung bei verschiedenen Konzentrationen der Aminosäure und des Zuckers genau quantitativ verfolgt, was bis dato noch nicht geschehen war. Dabei wurde der Einfluß einer auf der Aminosäure als Stickstoffquelle heranwachsenden und einer fertig gebildeten Hefe getrennt behandelt und dazu die Wirkung von verschieden stickstoffhaltigen Hefen in das Bereich der Untersuchung gezogen. Weiterhin wurde zur Entscheidung gebracht, in welcher Lebensperiode der Hefe die Überführung von Leucin in Amylalkohol vor allem stattfindet, wobei die durch die früheren Resultate erworbenen Kenntnisse über den Stickstoffumsatz bei der Gärung wertvoll befunden wurden. Dann wurde geprüft, bis zu welchem Maße sich Fuselöl bei der Selbstvergärung der Hefe bildet und wie sehr sich die Fuselölbildung dadurch steigern läßt, daß man der Hefe Selbstverdauungsprodukte ihres Eiweiß als Stickstoffquelle bietet, weil bekannt ist, daß Aminosäuren bei der Selbstverdauung entstehen. Darauf wurde selbstverdauender Hefe Leucin zugesetzt und durch die Fuselölbestimmung des Destillates ermittelt, ob etwa die nach dem Absterben des Protoplasma noch wirksam bleibenden Enzyme die Umwandlung der Aminosäure in Alkohol vollziehen können[1]). Auch die Möglichkeit der Überführung von Leucin in Amylalkohol durch Acetondauerhefegärung wurde geprüft. Da diese die Überführung nicht besorgen kann, kam ich auf den Gedanken, ob vielleicht die Fuselölbildung getrennt von der Alkoholbildung verlaufen kann. Deshalb wurde versucht, die Umwandlung durch sich vermehrende und nicht gärende Hefe zu erreichen,

[1]) Von vornherein soll jedoch betont werden, daß Ehrlich (Ber. **39**, 4072. 1906) neuestens angedeutet hat, daß die Fuselölbildung aufs engste mit dem Eiweißaufbau der Hefe zusammenhängt, d. h. von Enzymen veranlaßt wird, deren Abtrennung von der lebenden Zelle bisher in keinem Falle gelungen ist, ohne diese Ansicht bis jetzt allerdings durch Versuche zu stützen.

indem dieser in Abwesenheit von Zucker eine andere Kohlenstoffquelle und Leucin als Stickstoffnahrung geboten wurde.

In der zweiten Reihe meiner Versuche war keine Fuselöl gebende Aminosäure präformiert in der Nährlösung enthalten, so daß sie erst durch die Lebenstätigkeit der Hefe in die Lösung gelangen mußte. Da das Fuselöl aus stickstoffhaltigen Substanzen entsteht, so ließ sich voraussehen, daß die Stickstoffnahrung der Hefe auch unter solchen Umständen von Einfluß auf die Menge des gebildeten Fuselöls sein würde. Um dies zu erforschen, wurden die im Teil II verwandten Gärversuche mit Pepton, Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak als Stickstoffquellen auf Fuselöl untersucht. Hier ließ sich wieder ein Zusammenhang zwischen der durch gesteigerte Stickstoffgabe wachsenden Ausscheidung bei der Gärung und der Überführung dieser Ausscheidungsprodukte in Fuselöl erwarten. Die Untersuchung lehnte sich an die im praktischen Betriebe herrschenden an, sodaß erwogen werden konnte, ob der Zusatz von assimilierbarem Stickstoff zu einer Maische Steigerung oder Abfall in der Fuselölbildung hervorrufen würde? Zu diesen Prüfungen gehörten weiterhin die Variationen von Faktoren, die auch in der Praxis eine Rolle spielen, wie Einfluß der Temperatur, des Säuregrades oder der Säureabstumpfung, der Zuckerkonzentration und der Dauer der Gärung. Dazu gehört auch die Beantwortung der Frage, zu welcher Periode der Gärung Fuselöl hauptsächlich gebildet wird? Auch die Bildung von Fuselöl durch gärende Schimmelpilze wurde mit Mucor razemosus auf Würze geprüft.

Zum Schluß mußten die für die Bildung von Fuselöl gewonnenen Resultate mit denen der Glyzerin- und Bernsteinsäurebildung, deren Beeinflussung durch dieselben Faktoren schon von anderer Seite ergründet worden war, in Vergleich gesetzt werden.

Die Methode der Fuselölbestimmung.

Die erste Voraussetzung für die Durchführbarkeit einer Untersuchung über den quantitativen Fuselölgehalt des bei verschiedenartigen Gärungen gebildeten Alkohols ist eine genügend genaue Bestimmungsmethode für die höheren Alhohole. Ihre Abtrennung durch fraktionierte Destillation, wie sie in der Praxis gehandhabt wird, konnte hier nicht in Betracht kommen, da bei so

verschiedenen Versuchsanstellungen, wie sie meine Untersuchung forderte, nur geringe Gärflüssigkeitvolumina der Gärung überlassen werden konnten. Daß trotz dieser Voraussetzung die ganze Durchführbarkeit der Arbeit nur durch die Überlassung von reichlich Platz im Brutzimmer, wie er mir durch die Güte des Direktors zur Verfügung gestellt wurde, ausführbar war, geht aus den zahlreichen Parallelversuchen der Arbeit hervor.

Daß die Trennung von Körpern, die sich chemisch so nahe stehen wie Alkohol und Alkohole mit mehr Kohlenstoffatomen, auf besondere Schwierigkeiten stößt, besonders wenn die Mengen der zu bestimmenden höheren Alkohole im Verhältnis zum Äthylalkohol so gering sind, wie das immer beim Fuselöl der Fall sein muß, ist von vornherein klar. Schon im Jahre 1896 konnte daher eine Zusammenstellung von mehr als dreihundert Arbeiten über diese Untersuchungsmethode gemacht worden[1]). Amtlich eingeführt ist jetzt die Rösesche Methode[2]), bei der die Volumenszunahme gemessen wird, die fuselhaltiger Alkohol erleidet, wenn er nach Zusatz von etwas Schwefelsäure mit Chloroform ausgeschüttelt wird. Bei Beachtung der unerläßlichen Vorschriften von Gasenapp[3]) wird die Methode genügend genau. Die Notwendigkeit, den zu untersuchenden Alkohol entweder durch Zusatz von Wasser oder völlig fuselfreiem absolutem Alkohol auf 30 Volumenprozent zu bringen, würde aber gerade für meine Untersuchungen zwei Gefahren mit sich bringen. Erstens wird durch eine kleine Ungenauigkeit in der Einstellung auf 30 Volumenprozent die ganze Bestimmung verfehlt und nicht ein in gewissen Prozentsätzen falsches, sondern ein völlig falsches Resultat, das mit dem Fuselölgehalt des zu untersuchenden Alkohols in gar keinem Zusammenhang mehr steht, gewonnen und zweitens ist es so schwer, völlig fuselfreien absoluten Alkohol zu erhalten, daß bei den geringen Mengen des zu messenden Fuselöls die Gefahr vorlag, durch den mit dem absoluten Alkohol unfreiwillig zugesetzten die Menge des zu bestimmenden stark zu vermehren. Denn da in allen Fällen eine durch die Gärung bereitete alkoholische Flüssigkeit von

---

[1]) W. D. Bigelow, Journal of the American Chemical Society. **18**, 397—402.

[2]) Centralbl. für das deutsche Reich **1895**, 305. Nr. 25 und Alkoholermittlungsordnung Berlin **1900**, 15. Julius Springer.

[3]) Ztschr. f. angewandte Chem. **1895**. 657.

geringem Alkoholgehalt zur Fuselölbestimmung destilliert werden mußte, konnte das zu untersuchende Destillat nur eine begrenzte Menge Alkohol enthalten, die 12 % in fast allen Fällen nicht überstiegen hat.

Diese beiden Gefahren barg das von Beckmann[1]) vorgeschlagene und neuerdings verbesserte[2]) Verfahren nicht in sich. Erstens wird bei ihm die durch Ausschütteln mit Tetrachlorkohlenstoff vom Alkohol getrennte Fuselölmenge durch Veresterung mit salpetriger Säure und Titration des Amylnitrits mit Permanganat direkt bestimmt, und zweitens hat die Methode bei ganz mechanischer Handhabung eine bestimmte Fehlergrenze, die nicht so sehr von dem persönlichen Fehler des Operators wie von anderen Momenten abhängt. Diese Fehlergrenze wurde von Lücken[3]) im ungünstigsten Falle zu ± 10 % angegeben.

Die Fehler sind die Folge des Zusammenwirkens dreier Faktoren. Erstens der Schwierigkeit der Trennung des Fuselöls von Alkohol; zweitens der Berechnung aller im Fuselöl enthaltenen Alhohole, die doch in ihrem Verhältnis zueinander in verschiedenen Fällen schwanken, auf Amylalkohol und drittens der Oxydation des Fuselöls selbst bei der Endtitration der in Freiheit gesetzten salpetrigen Säure durch das Permanganat. Der erste Fehler kommt in den meisten Fällen bei meinen Bestimmungen weniger in Betracht, da meist nahezu übereinstimmende Alkoholkonzentrationen untersucht wurden, und es fast nur auf Vergleichsresultate ankam. Der zweite Fehler ist nicht zu vermeiden und dem dritten suchte ich durch möglichst genaue Übereinstimmung in der Handhabung der Titration zu begegnen. Hier wurde die einzige Vereinfachung der Methode vorgenommen, die aber vielleicht gerade für die Praxis von Wert sein kann, und das schwer zu beschaffende Eis durch etwa 250 ccm kaltes Wasser ersetzt. Dabei wurde das Permanganat aber immer im Überschuß gehalten, also ein Teil auch schon vor Beginn der Titration dem Wasser zugesetzt und im ganzen vom ersten Moment der Vereinigung von Permanganat mit der salpetrigsauren Lösung fünf Minuten bis zum Ablesen des Titers verstreichen gelassen. Zurücktitriert wurde mit Mohrschem Salz.

---

[1]) Ztschr. für Untersuchung von Nahrungs- und Genußmitteln **2**, 709. 1899 und **4**, 1059. 1901.

[2]) Dieselbe Ztschr. **10**, 143. 1905.

[3]) Dissertation. Leipzig **1904**. 26.

Ich möchte noch hervorheben, daß die von Beckmann angegebene verkürzte Methode für meine wissenschaftlichen Zwecke nicht geeignet schien und nie verwandt wurde. Eine Probeanalyse mit gewogenen Mengen Amylalkohol gab folgendes Resultat.

Abgewogen 0,08008 g Amylalkohol.
Titer 10 ccm Mohrsches Salz = 9,5 ccm Permanganat.
1 ccm Permanganat auf Eisen eingestellt = 0,0037 g Fe.
auf Amylalkohol berechnet = 0,0002910 g.
Titriert 31,2 ccm Permanganat.
2,4 ccm Ferroalaun.
Gefunden 0,08310 g Amylalkohol oder 103,7 % der Theorie.

Der Titer der Permanganatlösung, die im Dunkeln aufbewahrt wurde, wurde häufig durch Vergleich mit Eisen korrigiert. Auch aus der Übereinstimmung der reichlich ausgeführten Doppelbestimmungen, wie sie die folgenden Resultate zeigen, geht deutlich hervor, daß die Methode in meiner Hand für die Schlüsse ausreicht, die aus den Resultaten gezogen wurden. Deshalb wurden nach ihr alle Fuselölbestimmungen ausgeführt, die nach meinem Dafürhalten die Mühe einer mehr als einstündigen Arbeit pro Fuselöl-Bestimmung lohnen.

Zum Schluß sei noch angegeben, daß die vereinigten Tetrachlorkohlenstoffmengen durch zweimaliges Schütteln mit konz. Schwefelsäure, Nachschütteln mit Wasser, verdünnter Natronlauge und wieder mit Wasser, Entwässerung mit Chlorcalcium und schließliche Destillation bequem zu reinigen sind. Verwendet man den billigen Tetrachlorkohlenstoff der Technik, dann empfiehlt es sich, ihn für ein paar Tage unter einer Permanganatlösung stehen zu lassen und ihn dann wie vorher zur Analyse benutzen zu reinigen.

Die Abhängigkeit der Fuselölbildung von der Stickstoffernährung der Hefe.

Die Methode der Versuchsanstellung und die Zusammenstellung der gewonnenen Resultate in Tabellen.

Die Beschreibung der Einzelversuche wird durch eine Besprechung derjenigen Versuchsanstellung, die fast durchgehend verwandt wurde, abgekürzt. Für die Abweichung von ihr wird auf die Spezialteile verwiesen.

Aus den 250 ccm Nährlösung, die schon zur Bestimmung der Gärwirkung verschiedener Hefen bei verschiedenen Stickstoffquellen und Konzentrationen für den zweiten Teil der Arbeit gedient hatten, wurden 150 ccm mit Dampf abgetrieben, um mit Sicherheit allen Alkohol und alles Fuselöl in das Destillat zu bekommen[1]). Diese 150 ccm reichten dann zu einer pyknometrischen Alkoholbestimmung, die mit 50 ccm bei 15° ausgeführt wurde und zu zwei Fuselölbestimmungen à 50 ccm. Bei Verlusten oder nicht gut stimmenden Resultaten konnten auch die 50 ccm des gewogenen Alkohols noch zu einer Fuselölbestimmung verwandt werden.

Die gefundenen Werte für 50 ccm des Destillates und der Prozentgehalt an Alkohol des Destillates sind in die Tabellen zuerst eingetragen. Aus ihnen berechnet sich der Prozentgehalt der vergorenen Flüssigkeit an Fuselöl durch Multiplikation mit 12, des für 50 ccm Destillat gefundenen Wertes und der Prozentgehalt der vergorenen Flüssigkeit durch Multiplikation mit 6 des für das Destillat gefundenen Alkoholprozentgehaltes. Aus dem Verhältnis der beiden Werte zueinander berechnet sich weiter der Fuselölgehalt des bei der Gärung gebildeten absoluten Alkohols. Nach der früheren Anschauung über die Anhäufung des Fuselöls gerade bei der Nachgärung schien es nicht richtig eine völlige Vergärung der 15 % Zucker abzuwarten. Deshalb wurden die ersten Versuche bei einem durchschnittlichen Kohlensäureverlust von 16 g pro 250 ccm Lösung abgebrochen. Ein scharf übereinstimmender Alkoholgehalt der Lösung zum Zeitpunkte der Destillation konnte natürlich auf diese Weise nicht erreicht werden. Deshalb sind die Resultate der Alkoholbestimmungen unter sich nicht gut übereinstimmend. Nachdem sich noch im Laufe der Untersuchung herausgestellt hat, daß die Anhäufung von Fuselöl während der Nachgärung gar nicht stattfindet, sondern daß die Hauptmenge des Fuselöls gerade im ersten Gärstadium gebildet wird, empfiehlt es sich, mehr die absoluten Fuselölmengen, die in den Tabellen angegeben sind, zum Vergleich heranzuziehen, als die auf Alkohol bezogenen. welche infolge der schwankenden Alkoholmengen beeinflußt sind.

---

[1]) Vergl. hierzu Duclaux, Traité de Microbiologie Vol. 3, 367. Il faut pousser la destillation à $^{6}/_{10}$ de la liquide et ne pas s'arrêter au tiers où à la moitié de la liquide.

a. Der Einfluß des Leucingehaltes der Zuckerlösung auf die Menge des gebildeten Fuselöls.

Racemisches Leucin.

1. Bei minimaler Einsaat durch wachsende Hefe.

Zu den in seiner Veröffentlichung angegebenen Versuchen, welche die Überführung von Leucin in Amylalkohol illustrieren, hat Ehrlich nur eine Leucinkonzentration dem Einfluß der gärenden Hefe ausgesetzt. Um den Beweis zu führen, daß Leucin durch die Gärung in Amylalkohol verwandelt wird, genügt diese Fragestellung; nicht jedoch, wie sich zeigen wird, um die Frage zu entscheiden, bis zu welchem Grade Leucin durch die Gärung in Amylalkohol übergeführt wird. Des weiteren verwandte Ehrlich bei seinem Versuch eine im Verhältnis zum Volumen der Nährlösung sehr große Hefemenge, eine Menge, die jedenfalls viel größer war als die, welche in der Nährlösung durch Wachstum hätte entstehen können. Diese Versuchsanstellung eignet sich besonders zu bequemer Ausführung seines Experimentes, da sie die Nebenentwicklung von Fremdorganismen unterdrückt[1]) und die Vergärung des Zuckers in kurzer Zeit vollzieht. Sie entspricht jedoch nicht den in der Praxis vorkommenden Fällen, in denen sich die Hefe in der Nährlösung erst entwickeln muß, ehe sie die Vergärung hervorruft. Schließlich ist Ehrlichs Methode der Abtrennung des gebildeten Amylalkohols vom Äthylalkohol durch fraktionierte Destillation zwar sehr geeignet, um erst einmal zu beweisen, daß wirklich Amylalkohol gebildet war, aber durchaus nicht quantitativ. Ebensowenig kann man das von der Wiedergewinnung des unverbrauchten Leucin durch Eindampfen und Kristallisation der vergorenen Lösung sagen.

Um daher zu entscheiden, wie weit die Überführung des Leucin in Amylalkohol vor sich geht, wenn beim Einimpfen einer geringen Hefemenge erst Wachstum und dadurch bedingte Vergärung erfolgt, wurden Nährlösungen mit Leucin als einzige Stickstoffquelle hergestellt. Für die Zusammensetzung der Nährlösung

---

[1]) Doch möchte ich auch für die racemische Spaltung von Aminosäuren durch Hefe, reiner Hefe den Vorzug geben, weil der in gewöhnlicher Preßhefe immer vorhandene Kahm durch die Alkoholbildung doch nicht am Wachstum gehindert wird und sich reichlich auf die Flüssigkeitsoberfläche entwickelt.

waren des Vergleichs wegen die Ehrlichschen Konzentrationen ausschlaggebend. Es wurden in allen Fällen 15 % Rohrzucker verwandt und 0,3 % chemisch reines durch Synthese gewonnenes racemisches Leucin, ein einfaches Multiples oder ein einfacher Teil desselben hinzugefügt. Die Zusammensetzung der Nährsalze ist aus Teil II zu entnehmen.

Tabelle I. Synthetisches Leucin.

15 % Zucker. Salze.

a) Mit Logos-Hefe beimpft.

g Leucin in 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat: g Fuselöl in 50 ccm Destillat	150 ccm Destillat: % Alkohol des Destillats	% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol d. vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols	
abgewogen	berechnet	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet	berechnet	
3	0,321	I. 0,0788 [1] II. 0,0791	10,50	0,0947	6,30	1,50	
1,5	0,1605	I. 0,0881 II. 0,0830	10,89	0,1027	6,53	1,57	
0,75	0,0803	I. 0,0669 II. 0,0645	10,52	0,0788	6,31	1,25	
0,38	0,0401	I. 0,0730 II. 0,0702	10,29	0,0859	6,17	1,40	
0,19	0,0200	I. 0,0423 II. 0,0451	9,99	0,0524	6,00	0,87	
0,095	0,0100	0,0410	11,80	0,0492	7,08	0,70	
b) Mit viel Hefe versetzt.							
1,5	0,1605	0,1616	12,50	0,1939	7,50	2,59	Preßhefe
0,75	0,0803	0,0922	11,07	0,1106	6,64	1,67	Preßhefe
0,178	0,0200	0,0572	11,04	0,0686	6,62	1,04	Preßhefe
0,75	0,0803	0,0699	11,70	0,0839	7,02	1,19	Logos-Hefe in Würze herangezogen

Die Versuchsresultate sind in Tabelle I zusammengestellt. Sieht man von den Schwankungen in den Mengen des gebildeten

[1] I. und II. sind Doppelbestimmungen. Die Berechnung basiert auf dem arithmetischen Mittel zwischen beiden.

Fuselöls ab, die schwer zu erklären sind, weil sie größer als die der Doppelbestimmungen der Einzelgärungen sind, so zeigt sich mit Deutlichkeit, daß durch die wachsende Logos-Hefe bei der Vergärung der 15 %igen Zuckerlösung oberhalb 0,38 g Leucin pro 250 ccm Lösung kein Ansteigen im Fuselölgehalt des gebildeten Alkohols zu bemerken ist. Bei 0,19 g Leucin ist die Menge des Fuselöls dann aber weit geringer und beträgt nur noch wenig mehr als die Hälfte des gebildeten Maximums unter den angegebenen Verhältnissen. Der Prozentgehalt des gebildeten Alkohols an Fuselöl hatte dabei 1,5 % nicht wesentlich überschritten.

2. Bei großer Aussaat von Hefe, die Wachstum während der Gärung ausschloß.

Vergleicht die im vorstehenden diskutierten Resultate mit einem andern, das auch bei der Vergärung einer 15 %igen Zuckerlösung aber bei großer Aussaat erhalten wurde, so findet man, daß die Menge der verwandten Hefe und die Vergärung des Zuckers ohne vorhergehendes Hefewachstum wenigstens bei der einen Leucinkonzentration keine Veränderung im gewonnenen Resultat hervorruft. 0,75 g Leucin gaben mit einer großen Hefemenge, die auf Würze herangezogen war, genau dieselben Amylalkoholmengen, wie durch die aus minimaler Einsaat mit dem Leucin als Stickstoffquelle erzielt worden war. —

Bedient man sich zur Vergärung einer stickstoffärmeren Hefe und zwar einer nach dem Lüftungsverfahren gewonnenen Preßhefe, dann stieg die gebildete Amylalkoholmenge bedeutend gegenüber den Resultaten mit denselben Leucinkonzentrationen bei stickstoffreicherer Hefe. Wie im zweiten Teil angegeben reichert sich eine stickstoffarme Hefe bei der Vergärung von Zuckerlösungen in Gegenwart assimilierbarer Stickstoffsubstanzen mehr mit Stickstoff an als eine stickstoffreiche Hefe. Ihr Stickstoffumsatz ist bedeutender und er wächst mit wachsender Stickstoffkonzentration der Nährlösung ebenso wie die Mengen des gebildeten Fuselöls. Der Zusammenhang zwischen dem Stickstoffumsatz einer Hefe und den Mengen Fuselöl, die sie aus Aminosäuren bildet, tritt hier also deutlich hervor.

Bei diesem Versuch war schon eine Steigung des Prozentgehaltes an Fuselöl bezogen auf den Alkohol bis zu 2,5 % erreicht worden.

Ehrlich[1]) gibt an, daß er auf demselben Wege einen Alkohol mit 3 % Amylalkohol erzielt habe, während Effront[2]) nach demselben Verfahren bis zu 5—6 % Amylalkohol gekommen sein will.

Da nun der Stickstoffumsatz bei der Vergärung von Zuckerlösungen in Gegenwart assimilierbaren Stickstoffs am Anfang der Gärung am größten ist, lag es nahe den Versuch zu machen durch geringere Zuckergabe die Bildung des Äthylalkohols zu beschränken und so noch zu höheren Amylalkoholprozenten dieses zu gelangen.

Die zu diesem Zweck angestellten Versuche sind in der Tabelle II vereinigt. Mit 1,5 g Leucin pro 250 ccm Nährlösung wurden bei 7,5 % Zucker 4,35 % Amylalkohol, bei 2 % Zucker 7,06 % Amylalkohol und bei 1 % 5,33 % Amylalkohol bezogen auf den gebildeten Alkohol erzielt. Bei 2 % Zucker war die Amylalkoholkonzentration des Gärungsäthylalkohols also am größten. 1 % Zucker gestattete nur die Bildung von weniger Amylalkohol als 2 % Zucker im Vergleich zum Äthylalkohol. Steigerte man die Leucingabe bei 1 % Zucker noch über 1,5 g Leucin pro 250 ccm Lösung hinaus, so wuchs zwar die Amylalkoholkonzentration des gebildeten Alkohols wieder, sie erreichte aber nicht das Maximum der bei 2 % Zucker und 1,5 g Leucin gebildeten Menge.

Tabelle II. Synthetisches Leucin.
Bei verschiedenen Zuckerkonzentrationen.
Mit viel Preßhefe vergoren.

% Zucker	g Leucin in 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat: g Fuselöl in 50 ccm Destillat	150 ccm Destillat: % Alkohol des Destillats	% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol d. vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
abgewogen	abgewogen	berechnet	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet	berechnet
7,5	1,5	0,1605	I. 0,1237 II. 0,1160	5,51	0,1438	3,31	4,35
7,5	0,178	0,0200	0,0357	5,38	0,0428	3,23	1,33
2	1,5	0,1605	0,0471	1,33	0,0565	0,80	7,06
1	2,198	0,2349	0,0270	0,84	0,0324	0,50	6,48
1	1,5	0,1605	0,0227	0,85	0,0272	0,51	5,33

[1]) Diese Ztschr. 2, 71. 1906.
[2]) Chem. Centralbl. 1905, II. 1811.

Aus diesen Resultaten folgt erstens, daß ich die bis jetzt höchste Amylalkoholkonzentration des Gärungsalkohols nach dem Ehrlichschen Verfahren mit 7 % erreicht habe und daß zwischen 7,5 % und 2 % Zucker bei einer Leucingabe von 1,5 g pro 250 ccm die höchsten Amylalkoholkonzentrationen für diese Leucinkonzentration zu erreichen sind.

Die von mir angegebene Versuchsanstellung eignet sich durch die Bequemlichkeit der Handhabung und die geringen Flüssigkeitsmengen und Leucinquantitäten sehr, um durch zahlreiche Kombinationsversuche verschiedener Leucin- und Zuckerkonzentrationen den bestmöglichen Weg zur Ausnützung des Ehrlichschen Patentes[1]) zu ermitteln, nach dem die der Technik mangelnden Fuselölmengen beschafft werden sollen.

Verhältnis des in Amylalkohol übergeführten Leucins zum Leucingehalt der Lösung.

Um die absoluten Mengen des in Amylalkohol verwandelten Leucins zu beurteilen, eignen sich die aus den Tabellen I und II berechneten Werte, welche in den Tabellen III und IV vereint sind. Durch wachsende Hefe steigt die prozentische Menge des in Amylalkohol verwandelten Leucins mit abnehmender Leucinkonzentration an, bis bei 0,19 g Leucin pro 250 ccm 100 % des Leucins verschwunden waren. Bei noch geringerer Leucingabe von 0,095 g pro 250 ccm Lösung findet sich mehr als die theoretisch mögliche Fuselölmenge bezogen auf die Leucingabe nämlich 192,7 %. Dies kann nur so erklärt werden, daß durch den Stickstoffumsatz während der Gärung dieselben Stickstoffmengen mehrmals in Form von Aminosäuren wiedererscheinen und auf diese Weise immer neue Amylalkoholmengen aus ihnen gebildet wurden. Dieses Resultat wurde schon im ersten Teil theoretisch verwertet und genau erklärt. Mit viel Hefe, die nicht wächst, wird der Angriff des Leucins ein größerer. Der Wert für die 143,6 % umgewandeltes Leucin dürfte hier dadurch seine Erklärung finden, daß bei so geringer Leucinkonzentration wie 0,178 g die aus der großen Hefemenge bei der Gärung austretenden Aminosäuren sich zu der ursprünglichen Leucingabe addiert und dadurch einen so

[1]) F. Ehrlich, D. R.-P. 177174.

hohen Befund, der scheinbar die theoretische Menge übertraf, vorgetäuscht haben.

In seiner Veröffentlichung[1] „Über eine Methode zur Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Hefe“ zeigt Ehrlich, daß die Hefe das l-Leucin angreift und das d-Leucin unverändert lassen kann. Daß aber auch das d-Leucin der Umwandlung in Amylalkohol durch die Hefe unterliegen kann, hat auch Ehrlich bemerkt, denn er gibt dieser Beobachtung folgenden Ausdruck: „Schließlich sei hier noch darauf hingewiesen, daß bei dem Leucin und der Aminovaleriausäure ebenso wie beim Alanin, außer der natürlich vorkommenden Komponente offenbar stets auch ihr optischer Antipode von der Hefe angegriffen wird, da, wie die Ausbeutezahlen zeigen, immer nur $^2/_3$—$^3/_4$ der theoretisch berechneten Menge der einen optischen Modifikation zurückzugewinnen war.“

Tabelle III. Verhältnis des in Amylalkohol übergeführten Leucins zum Leucingehalt der Lösung.
(Berechnet aus Tabelle I.)

a) Mit Logos-Hefe beimpft.

g Leucin in 250 ccm Lösung	In Amylalkohol verwandeltes Leucin g	% der theoretisch möglichen Menge	
3	0,353	11,8	
1,5	0,382	25,5	
0,75	0,293	33,9	
0,38	0,320	84,2	
0,19	0,195	102,6	
0,095	0,183	192,7	
b) Mit viel Hefe versetzt.			
1,5	0,722	48,1	Preßhefe
0,75	0,412	55,0	Preßhefe
0,178	0,256	143,6	Preßhefe
0,75	0,312	41,6	Logos-Hefe in Würze herangezogen

Diese Beobachtung findet durch die Zusammenstellung der Tabelle III eine Bestätigung. Die Hefe bevorzugt in der Tat das l-Leucin. Steht ihr jedoch keine genügende Menge dieses zur Verfügung, so greift sie auch die andere optische Antipode an.

[1] Diese Ztschr. 1, 7. 1906.

Der Übergang vom Angriff des l-Leucin zum d-Leucin ist kein krasser, sondern ein gradueller, wie die allmählich ansteigenden Werte für das als Amylalkohol erscheinende Leucin in der vergorenen Flüssigkeit mit wachsender Leucinkonzentration zeigen. Die von Ehrlich gewählte Leucinkonzentration von 3 g Leucin pro l oder 0,75 g Leucin pro 250 ccm Lösung war bei 15 % Zucker eine sehr glückliche. Denn da in meinem Versuch bei großer Aussaat von Preßhefe 55 % des Leucin als Amylalkohol erschienen waren, so war offenbar alles l-Leucin verschwunden, ohne daß viel des d-Leucin in Mitleidenschaft gezogen worden war. Bei 1,5 g Leucin waren nur 48 % des Gesamtleucin verschwunden, sodaß noch die Gefahr vorhanden war, unzersetztes l-Leucin zurückzugewinnen, während mit niederer Leucinkonzentration als 0,75 g mehr d-Leucin hätte geopfert werden müssen. Meine Methode der Versuchsanstellung eignet sich daher auch gut dazu, um zu begründen, wie man nach dem Ehrlichschen Spaltungsverfahren racemischer Aminosäuren zu der besten Ausbeute gelangen kann.

Wie die in Tabelle IV zusammengestellten Berechnungen zeigen, ist die Ausnutzung der Aminosäure bei geringeren Zuckerkonzentrationen eine schlechtere, wie das zu erwarten war. Bei 7,5 % Zucker wird nur 35,7 % Leucin angegriffen, wenn die Leucinkonzentration 1,5 g war, wogegen bei 15 % Zucker 48,1 % verschwunden waren. Der Vergleich der gebotenen Zahlen ist zu einfach, als daß er durch viele Worte weiter belegt werden müßte.

Tabelle IV. Verhältnis des in Amylalkohol übergeführten Leucins zum Leucingehalt der Lösung.
(Berechnet aus Tabelle II.)
Mit viel Preßhefe vergoren.

% Zucker	g Leucin in 250 ccm Lösung	In Amylalkohol verwandeltes Leucin g	% der theoretisch möglichen Menge
7,5	1,5	0,535	35,7
7,5	0,178	0,160	89,9
2	1,5	0,210	14,0
1	2,198	0,121	5,5
1	1,5	0,101	6,7

Summiert man die so gewonnenen Resultate, so kommt man zu dem Schluß, daß die Intensität der Verwandlung von Leucin

in Amylalkohol durch die Hefe nicht nur von der Leucinkonzentration der Lösung, sondern auch von der Zuckerkonzentration und dem Stickstoffgehalt der verwandten Hefe abhängig ist. Sie steht jedenfalls in nahem Zusammenhang mit dem Stickstoffumsatz der Hefe während der Gärung und verstärkt sich wie dieser bei stickstoffarmer Hefe. Mit wachsender Hefe und bei 15 % Zucker wird bei 0,38 g Leucin pro 250 ccm ein Maximum an Amylalkohol erzielt, das mit steigender Leucingabe nicht mehr zunimmt. Durch Verminderung der Zuckerkonzentration läßt sich die Amylalkoholkonzentration des gebildeten Alkohols steigern. Sie erreicht in meinen Versuchen bis 7 % ihr Maximum. Wird auch die natürliche optische Antipode von der Hefe bevorzugt, so verschmäht sie auch nicht die andere, sodaß schließlich beide ganz als Amylalkohol wiedererscheinen können.

Leucin aus Melasserückständen.

Die im vorstehenden behandelten finden eine Ergänzung und Bestätigung durch ganz ebenso angestellte Versuche, in denen der Hefe, welche in minimaler Menge in die Nährlösung eingesät wurde, als einzige Stickstoffquelle aus Melasserückständen gewonnenes Leucin, dessen Darstellung Ehrlich[1]) genau beschrieben hat, geboten wurde. Die Resultate sind in Tabelle V vereinigt. Daß mit Melasseleucin des angegebenen Ursprungs weniger Fuselöl erhalten wurde als mit racemischem Leucin, findet seine Erklärung in der Unreinheit des Produktes. Immerhin geht aus der Tabelle klar hervor, daß der Fuselölgehalt des gebildeten Alkohols mit steigendem Leucingehalt der Gärflüssigkeit wächst. Für das mit 0,375 g Leucin gewonnene Resultat verweise ich auf die später bei verschiedenen Stickstoffquellen gegebene Erklärung. Das Maximum der in Amylalkohol überführbaren Leucinmenge ist offenbar wegen der Unreinheit des Produktes nicht erreicht worden; auch mögen die Verunreinigungen Stickstoff enthalten haben. Die Resultate werden hauptsächlich angeführt, um ihre typische Übereinstimmung mit denen der Tabelle I zu zeigen, da ja Leucin natürlichen Ursprungs doch anders als synthetisches hätte wirken können. Die Betrachtung auch hier auf das Verhältnis des in Amylalkohol übergeführten Leucin

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **37**, 1809. 1904.

zum Leucingehalt der Lösung auszudehnen, empfiehlt sich wegen der Unreinheit des Melasseleucins nicht.

Tabelle V. Leucin aus Melasserückständen.
15 % Zucker. Salze.
Mit Logos-Hefe beimpft.

g Leucin in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
abgewogen	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet	berechnet
3	I. 0,0462 [1]) II. 0,0487	11,0	0,0569	6,60	0,86
1,5	I. 0,0357 II. 0,0394	11,0	0,0451	6,60	0,68
0,75	I. 0,0202 II. 0,0260	11,8	0,0277	7,08	0,39
0,375	0,0324	7,26 [2])	0,0389	4,36	0,89

b. Der Einfluß verschiedener Stickstoffquellen in Abwesenheit Fuselöl gebender Aminosäuren auf die Menge des durch wachsende Hefe gebildeten Fuselöls.

Pepton. Asparagin. Schwefelsaures Ammoniak.

Nachdem nachgewiesen worden war, daß die Menge des sich bildenden Fuselöls von der Konzentration der Fuselöl gebenden Aminosäure der zur Gärung angestellten Zuckerlösung abhängt, mußte die weitere Frage der Beantwortung unterzogen werden, ob auch andere Stickstoffquellen, welche der Hefe Wachstum und Gärung ermöglichen, in verschiedenen Konzentrationen gesetzmäßigen Einfluß auf die Fuselölbildung ausüben. Von dem einfachsten Falle, der Umwandlung fertig gebildeter Aminosäuren in Fuselöl, wurde hiermit zu dem komplizierteren fortgeschritten, bei dem die Hefe erst die Umwandlung der stickstoffhaltigen Nährsubstrate in Aminosäuren vollziehen und die dazu geeigneten in Fuselöl überführen muß.

---

[1]) I und II sind Doppelbestimmungen des Fuselölgehaltes. Die Berechnung basiert auf dem arithmetischen Mittel zwischen beiden.

[2]) Die Gärung wurde hier nach 8 $^1/_2$ Monaten abgebrochen.

War nun im vorstehenden bewiesen worden, daß gesteigerte Anwesenheit von Leucin in der Nährlösung auch gesteigerte Fuselölbildung bedingt, und war im Teil II durch das Experiment nachgewiesen worden, daß mit wachsendem Stickstoffgehalt der Nährlösung auch wachsende Ausscheidung von Stickstoff durch die Hefe erfolgt, so stand jetzt aus der Kombination dieser beiden Faktoren in Erwartung, daß mit ansteigender Konzentration des Stickstoffs auch ansteigender Fuselölgehalt der vergorenen Flüssigkeit die Folge sein müsse. Dies wurde um so wahrscheinlicher, weil man nicht annehmen konnte, daß die Hefe jemals unter den obwaltenden Umständen das Maximum der Fuselölbildung bei reinem Leucin erreichen würde, da sie doch ihr Stickstoffbedürfnis erst auf andere Weise zu decken gezwungen war.

Diese beiden theoretischen Schlüsse wurden auch durch die nachstehenden zahlreichen Versuche bewahrheitet, mit der einen Einschränkung, daß bei sehr gering werdendem Stickstoffgehalt der Nährlösung wiederum eine Steigerung in der auftretenden Fuselölmenge gegenüber den minimalsten Mengen desselben bei dafür optimaler Stickstoffgabe erfolgt. Die Resultate lassen sich dann in folgendem Satz zusammenfassen: „In Abwesenheit von Fuselöl gebenden Aminosäuren wachsende und gärende Hefe erzeugt nie das Maximum des durch sie bei Gegenwart dieser gebildeten Fuselölmenge. Je geringer die gebotene Stickstoffgabe der Nährlösung an assimilierbarem Stickstoff desto geringer die Menge des gebildeten Fuselöls, bis zu einem niedrigsten Punkte der Stickstoffgabe, der für die Erzielung minimaler Fuselölmengen mit Rücksicht auf die Gärungstechnik optimal ist, von dem aus sich nach unten (wie nach oben) die Menge des sich bildenden Fuselöls steigert. Dieser Punkt liegt bei Logos-Hefe beim Pepton bei 0,0803 g Stickstoff, beim Asparagin bei 0,0201 g Stickstoff und beim schwefelsauren Ammoniak bei 0,0803 g Stickstoff pro 250 ccm Nährlösung. Auch hier einen Zusammenhang zwischen der Lage dieses Punktes und der Wirkung der verwandten Stickstoffquellen auf die Gärung herauszusuchen, empfiehlt sich wegen der Kompliziertheit der zusammenwirkenden Einflüsse auf den Grad der Fuselölbildung nicht. — Eine Erklärung für die gemachten Beobachtungen wird in der Zusammenfassung der Resultate am Schluß gegeben.

Verschiedene Hefen haben bei sonst gleichen Verhältnissen verschiedenen Einfluß auf die absolute Quantität der durch sie gebildeten Fuselölmengen. Bei Pepton bildet Frohberg-Hefe weniger Fuselöl als Logos-, bei Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak Weinhefe mehr als letztere.

Was aus Asparagin bei der Zuckergärung durch die Hefe wird, ist noch nicht festgestellt. Jedenfalls ist anzunehmen, daß es eine dem Leucin ähnliche Zersetzung erleidet, so daß die in meinen Versuchen mit Asparagin gefundene Fuselölmenge vielleicht auf die teilweise Messung einer Substanz zurückzuführen ist, die aus Asparagin direkt, wie Amylalkohol aus Leucin, gebildet wurde.

Die Resultate der zahlreichen Versuche sind in den Tabellen VI—X zusammengestellt. Über die absoluten Mengen des unter den obwaltenden Umständen sich bildenden Fuselöls zu spekulieren, erscheint mir unzweckmäßig. Man kann z. B. auch gar nicht aussagen, daß eine Stickstoffquelle mehr Fuselöl gibt als eine andere, da das so sehr von der Konzentration abhängig ist. Selbst die Konzentrationen zu vergleichen und die Resultate zu verallgemeinern verbietet sich durch die von verschiedenen Hefen bedingten großen Schwankungen. So begnügt man sich am besten mit der in vorstehendem Satze aufgestellten allgemeinen Regel.

Tabelle VI. Pepton.

15 % Zucker. Salze.

Mit Logos-Hefe beimpft.

g Pepton in 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
		g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
abgewogen	berechnet	bestimmt		berechnet		
17,952	2,568	0,0403	10,74	0,0484	6,44	0,751
8,976	1,284	0,0435	11,42	0,0522	6,85	0,762
4,488	0,642	0,0345	10,74	0,0414	6,44	0,643
2,244	0,321	0,0286	10,66	0,0343	6,40	0,537
1,122	0,161	0,0097	10,89	0,0117	6,53	0,179
0,561	0,0803	0,0105	10,85	0,0126	6,51	0,192
0,281	0,0401	I. 0,0233 II. 0,0233	10,89	0,0280	6,53	0,429
0,140	0,0201	0,0217	10,07	0,0260	6,04	0,430

Tabelle VII. Pepton.

15 % Zucker. Salze.

Mit Frohberg-Hefe beimpft.

g Pepton in 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
		g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
abgewogen	berechnet	bestimmt		berechnet		
4,488	0,642	0,0257	11,42	0,0308	6,85	0,450
2,244	0,321	0,0251	11,88	0,0301	7,13	0,422
0,561	0,0803	0,0230	10,89	0,0276	6,53	0,422
0,281	0,0401	0,0146	9,06	0,0175	5,44	0,322
0,140	0,0201	0,0155	8,98	0,0186	5,40	0,344

Tabelle VIII. Asparagin.

15 % Zucker. Salze.

Mit Logos-Hefe beimpft.

g Asparagin + H_2O in 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
		g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
abgewogen	berechnet	bestimmt		berechnet		
3,436	0,642	0,0299	11,42	0,0359	6,85	0,524
1,718	0,321	0,0287	10,25	0,0344	6,15	0,560
0,859	0,161	0,0209	10,89	0,0251	6,53	0,384
0,429	0,0803	0,0163	10,78	0,0196	6,47	0,303
0,214	0,0401	0,0102	10,44	0,0122	6,26	0,195
0,107	0,0201	0,0349	10,25	0,0419	6,15	0,681

Tabelle IX. Asparagin.

15 % Zucker. Salze.

Mit Wein-Hefe beimpft.

g Asparagin + H_2O in 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
		g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
abgewogen	berechnet	bestimmt		berechnet		
3,436	0,642	0,0568	11,72	0,0682	7,03	0,970
1,718	0,321	0,0516	11,19	0,0619	6,71	0,923
0,859	0,161	0,0303	10,22	0,0364	6,13	0,594
0,214	0,0401	0,0333	11,72	0,0400	7,03	0,569
0,0535	0,0100	0,0480	11,96	0,0576	7,18	0,802

Tabelle X. Schwefelsaures Ammoniak.

15 % Zucker. Salze.

Mit Logos-Hefe beimpft.

g $(NH_4)_2SO_4$ in 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
		g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
abgewogen	berechnet	bestimmt		berechnet		
3,026	0,642	0,0291	9,06	0,0349	5,44	0,642
1,513	0,321	0,0181	10,59	0,0217	6,35	0,342
0,757	0,1605	0,0150	9,99	0,0180	6,00	0,300
0,378	0,0803	0,0184	10,52	0,0221	6,31	0,350
0,189	0,0401	0,0252	10,07	0,0302	6,04	0,500
0,095	0,0201	0,0285	10,52	0,0342	6,31	0,542
Mit Wein-Hefe beimpft.						
3,026	0,642	0,0249 [1]	5,70 [1]	0,0299	3,42	0,874
1,513	0,321	0,0320	8,49	0,0384	5,09	0,754
0,095	0,0201	0,0267	9,63	0,0320	5,78	0,553
0,047	0,0101	0,0246	9,56	0,0295	5,74	0,514

[1]) Infolge zu früher Unterbrechung Alkohol- und Fuselölgehalt niedrig.

c. Der Einfluß des Leucingehaltes der Zuckernährlösung in Gegenwart anderer Stickstoffquellen auf die Menge des gebildeten Fuselöls.

In allen Gärflüssigkeiten der Praxis sowohl wie in den künstlich mit Pepton, Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak angestellten sind die in Fuselöl überführbaren Aminosäuren, mögen diese nun von vornherein als Eiweißspaltungsprodukte vorhanden gewesen oder erst als Hefeaustrittsprodukte hineingekommen sein, neben anderen assimilierbaren Stickstoffquellen vorhanden. Da nun zu erwarten war, daß unter solchen Umständen eine Schützung der Aminosäure durch die anderen Stickstoffquellen eintritt und so nur eine geringere Menge dieser als bei ihrer alleinigen Gegenwart in Fuselöl übergeführt werden kann, so wird die Beurteilung aller praktisch möglichen Fälle sehr erleichtert, wenn man durch eine möglichst einfache Versuchsanstellung zu entscheiden

Tabelle XI. Leucin in Gegenwart von I. Pepton, II. Asparagin, III. schwefelsaurem Ammoniak.

15 % Zucker. Salze.

Mit Logos-Hefe beimpft.

	In 250 ccm Lösung	g Stickstoff in 250 ccm Lösung	Summa	150 ccm Dest.: g Fuselöl in 50 ccm Destillat	150 ccm Dest.: % Alkohol des Destillates	% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	abgewogen	berechnet		bestimmt		berechnet		
I.	Leucin 0,75 Pepton 0,561	0,0803 0,0803	0,1606	I. 0,0813 II. 0,0717	10,22	0,0918	6,13	1,50
	Leucin 0,375 Pepton 0,281	0,0401 0,0402	0,0803	0,0617	11,19	0,0740	6,71	1,10
II.	Leucin 0,375 Asparagin 0,429	0,0401 0,0803	0,1204	0,0338	11,27	0,0406	6,76	0,59
	Leucin 0,178 Asparagin 0,214	0,0201 0,0401	0,0602	0,0373	11,96	0,0448	7,18	0,62
	Leucin 0,089 Asparagin 0,107	0,0101 0,0201	0,0303	0,0314	10,96	0,0377	6,58	0,57
III.	Leucin 0,75 $(NH_4)_2SO_4$ 0,378	0,0803 0,0803	0,1606	0,0535	9,85	0,0642	5,91	1,09
	Leucin 0,375 $(NH_4)_2SO_4$ 0,189	0,0401 0,0402	0,0803	0,0480	11,12	0,0576	6,67	0,86

sucht, wie stark der Umsatz von Leucin unter solchen Verhältnissen wird.

Nach Abschluß der in Tabelle XI zu diesem Zweck angestellten Versuche publizierte auch Ehrlich[1]), daß wenn man der Hefe neben Zucker Leucin und Asparagin in gleicher Menge vorlegt, nur etwa die Hälfte des Leucin zu Amylalkohol umgesetzt wird.

Die Versuche wurden so angestellt, daß der Hefe in zwei Konzentrationen gleiche Stickstoffmenge als Leucin und Pepton, in zwei weiteren als Leucin und schwefelsaures Ammoniak und in drei anderen doppelte Stickstoffmenge als Asparagin und einfache als Leucin geboten wurde.

Zuerst zeigt sich wieder das frühere Gesetz, je größer die Stickstoffgabe, desto höher die Menge des gebildeten Fuselöls, da alle verwandten Konzentrationen über dem Minimalpunkte der Fuselölbildung lagen.

Aber erst die Zusammenstellung der Tabelle XII, in der zum Vergleich die Fuselölprozente der vergorenen Flüssigkeiten vereint wurden, welche bei der den Kombinationen entsprechenden Stickstoffkonzentration einerseits mit Leucin allein, andererseits mit den anderen verwandten Stickstoffquellen allein erreicht wurden, gestattet eine klare Übersicht über die gewonnenen Resultate. (Tabelle XII Seite 252.)

Die Vergleichstabelle XII zeigt: 1. daß durch die Anwesenheit einer anderen Stickstoffquelle die Menge des aus Leucin, — wenn dieses allein vorhanden ist, — gebildeten Fuselöls herabgesetzt wird, mit einer Ausnahme der größeren Stickstoffkonzentration von Leucin und Pepton, durch die merkwürdigerweise das Maximum der aus Leucin allein durch wachsende Hefe erzielbaren Fuselölmenge überschritten wurde;

2. daß durch Zusatz von Leucin die auf einer anderen Stickstoffquelle, — wenn diese allein vorhanden ist, — gebildete Fuselölmenge heraufgesetzt wird.

Die praktische Schlußfolgerung aus diesen Versuchen ist, daß in Gärflüssigkeiten, die von vornherein Leucin oder andere Fuselöl gebende Aminosäuren aus dem Eiweißzerfall der Rohmaterialien enthalten, immer mehr Fuselöl entstehen wird, als in solchen, die frei von Fuselöl gebenden Aminosäuren zur Gärung angestellt

---

[1]) Diese Ztschr. **2**, 76. 1906.

Tabelle XII. Vergleich zwischen dem Fuselölgehalt bei Gegenwart von Leucin und einer andern Stickstoffquelle (Pepton, Asparagin, schwefelsaures Ammoniak) mit dem bei ausschließlichem Gehalt von Leucin einerseits oder Pepton, Asparagin, schwefelsaurem Ammoniak andererseits.

Logos-Hefe.

	In 250 ccm Lösung	% Fuselöl der vergorenen Lösung	In 250 ccm Lösung	% Fuselöl der vergorenen Lösung	In 250 ccm Lösung	% Fuselöl der vergorenen Lösung
1.	Leucin 0,75 Pepton 0,561	0,0918	Leucin 0,75	0,0788	Pepton 0,561	0,0126
2.	Leucin 0,375 Pepton 0,281	0,0740	Leucin 0,385	0,0859	Pepton 0,281	0,0280
3.	Leucin 0,375 Asparagin 0,429	0,0406	Leucin 0,385	0,0859	Aspar. 0,429	0,0196
4.	Leucin 0,178 Asparagin 0,214	0,0448	Leucin 0,188	0,0524	Aspar. 0,214	0,0122
5.	Leucin 0,089 Asparagin 0,107	0,0377	Leucin 0,094	0,0492	Aspar. 0,107	0,0419
6.	Leucin 0,75 $(NH_4)_2SO_4$ 0,378	0,0642	Leucin 0,75	0,0788	$(NH_4)_2SO_4$ 0,378	0,0221
7.	Leucin 0,375 $(NH_4)_2SO_4$ 0,189	0,0576	Leucin 0,385	0,0859	$(NH_4)_2SO_4$ 0,189	0,0302

wurden. So wurde für diese schon von Ehrlich[1]) ausgesprochene und neuerdings durch einen Versuch gestützte Annahme (a. a. O.) eine durch mehrere Versuche erwiesene experimentelle Grundlage geschaffen.

Der Einfluß der Gärdauer auf die Menge des gebildeten Fuselöls.

Die Anschauung, daß am Ende der Gärung mehr Fuselöl gebildet wird als am Anfang oder zur Zeit der Hauptgärung, stützt sich hauptsächlich auf die früher schon von mir[2]) berücksichtigten Lindetschen[3]) Versuche, die einen Fall der Praxis untersuchten.

[1]) Ztschr. d. Vereins der deutschen Zucker-Industrie **55**, 550. 1905.
[2]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 304. 1905.
[3]) Lindet, Comptes rendus **57**, 182. 1888.

Es schien nun von Wichtigkeit, die Frage nach der zeitlichen Bildung des Fuselöls neu zu prüfen und vor allem verschiedenartig zusammengesetzte Nährlösungen der Vergärung durch Hefereinkulturen auszusetzen. Denn nach allen vorher gemachten Beobachtungen war zu erwarten, daß die ursprüngliche Anwesenheit in Fuselöl verwandelbarer Aminosäuren im Gegensatz zu Nährlösungen, in denen erst durch die Hefewirkung Aminosäuren in die Lösung kommen, auch auf die Bildung von Fuselöl zu verschiedenen Zeiten der Gärung von großem Einfluß sein würde.

Es wurden dieser Betrachtung entsprechend drei Arten von Nährlösungen verwandt und das Verhältnis des zu verschiedenen Zeiten aus ihnen gebildeten Fuselöls zum gebildeten Alkohol festgestellt. Zuerst eine ungehopfte Bierwürze. In ihr findet die Hefe löslich gemachte Eiweißstoffe, welche die Hefe selbst während der Gärung noch weiter spalten kann[1]). Nach Beijerink[2]) wirken die Hefen sämtlich proteolytisch auf die dem Nährboden zugesetzten Eiweißstoffe. Andererseits ist zu berücksichtigen, daß der Vorgang dieser Spaltung ein allmählicher sein muß, da nach T. Grownow und O. Grigoriew[3]) sowohl Zucker wie Alkohol hemmend wirken. Zieht man dazu noch in Betracht, daß Schütz[4]) angibt, daß Hefetrypsin die der Hefe eigenen Eiweißstoffe am schnellsten angreift, so sieht man, welche Fülle von Faktoren bei der Bildung von Aminosäuren während einer Würzegärung mitwirken können. So wird dieser der Praxis am genauesten nachgeahmte Fall auch am unübersichtlichsten. Einfacher gestalten sich die Verhältnisse auf dem zu zweit verwandten Nährboden mit schwefelsaurem Ammoniak als Stickstoffquelle, da hier alle Aminosäuren aus dem Stickstoffaustritt aus der Hefe herstammen müssen, der im Zusammenhang mit dem Stickstoffumsatz bei dieser Stickstoffquelle schon im Teil II erforscht wurde. Im dritten Falle wurde der Hefe von vornherein Leucin vorgesetzt, dazu aber die gleiche Stickstoffmenge in Form von Pepton geboten, um wieder genaueren Anschluß an einen praktisch möglichen Fall zu erreichen.

---

[1]) Vergleiche hierzu Delbrück. Wochenschr. f. Brauerei **1898**, Nr. 30.
[2]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **3**, 521. 1897.
[3]) Ztschr. f. physiol. Chem. **50**, 299. 1904.
[4]) Hofmeisters Beiträge **3**, 433. 1902.

Die Resultate der so geplanten Versuche sind in den Tabellen XIII, XIV und XV vereint.

Ungehopfte Bierwürze wurde in zwei Versuchsreihen einmal mit Frohberg- und ein zweites Mal mit Logos-Hefe vergoren. Die mit Frohberg-Hefe gewonnenen Analysenzahlen stammen aus der ersten Zeit meiner Versuchsanstellung. Damals wurde noch ein dem Volumen der Gärflüssigkeit gleiches mit Dampf abgetrieben. Dadurch wurden die gefundenen Werte für das Fuselöl sehr gering und naturgemäß mit einer großen Fehlerquelle behaftet. Dazu kommt, daß durch die Vergärung in verschiedenen Gefäßen eine noch weitere Möglichkeit der Verschiedenheit im Verlauf der Gärungen geboten war. So erklärt sich der hohe Alkoholgehalt am dritten Tage von 4,60% im Vergleich zu dem von 4,11 % am vierten Tage dadurch, daß die erste Gärflasche ohne Kohlensäureverschluß unter Watte vergoren war, wodurch, wie im Anhang des zweiten Teiles bewiesen, schnellere Vergärung erfolgt.

Sieht man von dieser Unregelmäßigkeit und der geringen Genauigkeit der Resultate infolge der zu niedrigen Analysenwerte ab, so kommt man zu dem Schluß. daß in einem Falle, wie dem untersuchten, bei Vergärung von Würze mit Hefereinkultur, keine Steigerung in der Menge des gebildeten Fuselöls bezogen auf die gleichzeitig gebildete Alkoholmenge gegen das Ende der Gärung hin zu beobachten ist, sondern daß im Gegenteil das Verhältnis Fuselöl zu Alkohol während der ganzen Gärdauer innerhalb der Versuchsfehler dasselbe ist.

Das Resultat der Versuchsreihe mit Frohberg-Hefe schien von so großer Wichtigkeit, daß es geboten war, die Versuche mit Unterdrückung der angegebenen Ungenauigkeiten zu erneuern. Um das Prinzip zu verallgemeinern wurde für die neue Versuchsreihe Logos-Hefe verwandt. Die Unregelmäßigkeit im Gärverlauf wurde dadurch unmöglich gemacht, daß die Proben an den verschiedenen Tagen auf sterile Weise durch Abhebern aus derselben Gärflasche entnommen wurden. Um höhere Analysenzahlen zu erhalten, ließ ich jedesmal 500 ccm Würze ab und destillierte nur 150 ccm. Die so mit Logos-Hefe gewonnenen Resultate bestätigen die mit Frohberg-Hefe erhaltenen in vollem Umfange. Der obenstehende Satz darf daher verallgemeinert werden.

Tabelle XIII. Ungehopfte Bierwürze.

In getrennten Gärgefäßen à 250 ccm.

Mit Frohberg-Hefe beimpft.

Anzahl der Tage	250 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	g Fuselöl in 50 ccm Dest.	% Alkohol des Destillates			
	bestimmt		berechnet		
3	0,0057	4,60	0,0114	4,60	0,25
4	0,0042	4,11	0,0084	4,11	0,20
5	0,0090	5,20	0,0180	5,20	0,35
6	0,0098	6,03	0,0196	6,03	0,33
7	0,0097	6,86	0,0194	6,86	0,28
20	0,0125	7,50	0,0250	7,50	0,33

In einem Gärgefäß.

Mit Logos-Hefe beimpft.

Anzahl der Tage	500 ccm abgezogen 150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
3	0,0179	18,68	0,0107	5,60	0,19
6	0,0194	23,86	0,0116	7,16	0,16
8	0,0205	26,25	0,0123	7,88	0,16
20	0,0295	30,50	0,0177	9,15	0,19

Des weiteren ergibt sich aus dem Vergleich der zwei Versuchsreihen, daß auf Würze Frohberg-Hefe mehr Fuselöl als Logos-Hefe bildet, worauf an anderer Stelle wieder zurückgekommen wird.

Tabelle XIV. 0,757 g $(NH_4)_2SO_4$ in 250 ccm Lösung.

15 % Zucker. Salze.

Mit Logos-Hefe beimpft.

Anzahl der Tage	250 ccm 150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	g Fuselöl in 50 ccm Dest.	% Alkohol des Destillates			
	bestimmt		berechnet		
12	0,0044	3,64	0,0053	2,18	0,250
24	0,0100	5,32	0,0120	3,19	0,376
32	0,0163	9,78	0,0196	5,87	0,334
Ende der Gärung	0,0173	12,58	0,0207	7,55	0,274

Schwefelsaures Ammoniak diente nun als Stickstoffquelle, wie die Tabelle XIV zeigt. Die Methode entsprach der früher verwandten. Die Gärflüssigkeiten wurden getrennt vergoren. Die Konzentration des schwefelsauren Ammoniaks war die für Logos-Hefe auf dieser Stickstoffquelle für die Erzielung einer schnellen Gärung in Teil II am günstigsten befundene.

Hier traten Schwankungen im Verhältnis Fuselöl zu Alkohol an verschiedenen Gärtagen auf, die ein Ansteigen des Faktors vom 12. bis zum 24. Tage und von da einen Abfall bis zum Ende der Gärung zeigen. Eine Anhäufung von Fuselöl am Ende der Gärung war wieder nicht zu bemerken.

Eine Kombination von Leucin und Pepton war die Stickstoffquelle in der letzten derartigen Versuchsreihe der Tabelle XV. Die Versuchsanstellung war wieder die gewöhnliche. Deutlich tritt hier hervor, daß bei ursprünglicher Gegenwart der in Fuselöl überführbaren Aminosäure das Maximum der Fuselölbildung in die erste Periode der Gärzeit fällt. Auch in dem einen Versuche mit Leucin als einziger Stickstoffquelle wurde zuerst mehr Fuselöl, nämlich 1,39 % als bei dem Durchschnitt der ganzen Gärung mit derselben Leucinmenge nämlich 1,25 %, wie aus Tabelle I ersichtlich ist, gebildet.

Tabelle XV.

0,375 g Leucin und 0,281 g Pepton pro 250 ccm Lösung.
15 % Zucker. Salze.
Mit Logos-Hefe beimpft.

Anzahl der Tage	150 ccm abgezogen 100 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	g Fuselöl in 50 ccm Dest.	% Alkohol des Destillates			
	bestimmt		berechnet		
7	0,0213	1,88	0,0284	1,25	2,27
10	0,0404	4,29	0,0539	2,86	1,90
12	0,0504	7,26	0,0672	4,84	1,39
16	0,0632	11,49	0,0843	7,66	1,10
	0,75 Leucin pro 250 ccm Lösung				
	250 ccm 150 ccm Destillat				
	0,0059	0,85	0,0071	0,51	1,39

Diese Retultate bestätigen auch die früher mit geringerer Zuckerkonzentration gewonnenen, bei denen durch einen Abbruch der Gärung in einer früheren Periode infolge Zuckermangels das Verhältnis Fuselöl zu Alkohol heraufgesetzt wurde.

Die zusammenfassende Schlußfolgerung aus den Resultaten über die zeitliche Bildung von Fuselöle während der Gärung lauten also, daß sich keine allgemeine Regel für die Gärperiode aufstellen läßt, in der das Maximum an Fuselöl gebildet wird. Die Zusammensetzung der Nährlösung ist hierfür ausschlaggebend.

In Fällen der Praxis wird bei Würzen kaum große Schwankung im Verhältnis Fuselöl zu Alkohol zu verschiedenen Gärperioden zu beobachten sein. In eiweißreichen Maischen, die ursprünglich reichlich Aminosäuren infolge der Proteolyse des Eiweiß bei der Mälzung und Maischung enthalten, ist die Angärungsperiode, die mit der Hefevermehrung zusammenfällt, auch die der intensivsten Fuselölbildung.

Jedenfalls kann keine Rede davon sein, daß sich nach Ablauf der Gärung Fuselöl in einer vergorenen Flüssigkeit irgendwelcher Art anhäufen kann[1]). Man braucht deshalb in praktischen Betrieben keine Scheu zu haben, die Gärung bis zum Ende durchzuführen, weil man fürchten könnte dadurch zu einem geringerem Alkohol zu gelangen.

Die Bildung von Fuselöl bei der Hefeselbstvergärung und bei der Vergärung mit Hefeselbstverdauungsprodukten als Stickstoffquelle. Die Überführung von Leucin in Amylalkohol durch selbstverdauende Hefe.

Daß zwischen den Eiweißzerfallprodukten toter Hefe bei der Selbstverdauung und den aus der lebenden Hefe während der Gärung austretenden eine gewisse Übereinstimmung herrscht, ist

---

[1]) Dadurch verlieren auch die Schlußfolgerungen an Wert, die Duclaux, Traité de Microbiologie 3, 435 aus den Versuchen von Raymann und Kruis, Chemisch-biologische Studien, Prag. (Verlag der Versuchsanstalt für Spiritus-Industrie) 1891 gezogen hat, wenn er sagt: „Diese Autoren haben gefunden, daß in den Fällen, wo am wenigsten Fuselöl gebildet war, die Hefe am längsten mit der Flüssigkeit zusammen war, so daß man folgern muß, daß der Amylalkohol am Anfang gebildet wird, und am Ende wieder verschwunden sei!

eine aus allen Erfahrungen über den Eiweißzerfall gerechtfertigte Annahme.

Nach Wahl und Nilson[1]) tritt bei der Gärung ein größerer Prozentsatz des Stickstoffs aus der Hefe aus (11,11 %), als durch einfache Dialyse in der Mischung von Wasser und Hefe (8,71). Doch kann diese Angabe nur lebende in Wasser aufgeschwemmte Hefe und nicht abgetötete betreffen.

Schützenberger[2]) gewann aus den wässerigen Extrakten der der Selbstverdauung überlassenen Hefe unter anderen Spaltungsprodukten Leucin. Dieselben Spaltungsprodukte fanden Kossel[3]) und Salkowski[4]). Doch auch Kutscher[5]) gewann aus selbstverdauter Hefe in neuerer Zeit keine andere Monoaminosäure. Dies dürfte der Anwendung der Fischerschen Estermethode für die Trennung der Verdauungsprodukte überlassen sein.

Daß bei der Selbstverdauung der Hefe Fuselöl gebende Abbauprodukte in Gestalt von Aminosäuren gebildet werden, schien daher außer Zweifel. Hier bot sich also eine Gelegenheit, die Eiweißzersetzung der Hefe während der Gärung nachzuahmen und zu prüfen, ob sich durch den ursprünglichen Zusatz solcher Produkte zur Gärflüssigkeit bei Verwendung dieser als Stickstoffquelle die Fuselölbildung intensieren ließ? Weiterhin war zu untersuchen, ob eine der Selbstvergärung ihres Glykogen überlassene Hefe dabei reichlich Fuselöl aus ihren Selbstverdauungsprodukten bildet. Denn diese Versuchsanstellung ist eine Nachahmung der in manchen Gärbetrieben z. B. bei der Weinproduktion herrschenden Verhältnisse, bei welchen am Ende einer Gärung, bei der sich reichlich Hefe gebildet hat, diese noch längere Zeit in der Gärflüssigkeit verweilt.

Im Zusammenhang mit diesem Versuche war ein anderer anzustellen, bei dem die Glykogengärung durch Verwendung von nur wenig Hefe unterdrückt, den Verdauungsenzymen jedoch durch Zusatz von Leucin ein schärferer Angriffspunkt geboten wird. Dadurch sollte entschieden werden, ob die Umwandlung

---

[1]) American Brewers Review **1902**, 37 nach Kochs Jahresbericht **13**, 239. 1902.

[2]) Bulletin de la Soc. chimique de Paris **21**, 194 und 204. 1874.

[3]) Ztschr. f. physiol. Chem. **3**, 284. **4**, 291. **5**, 251 und 265.

[4]) Ztschr. f. physiol. Chem. **13**, 506.

[5]) Ztschr. f. physiol. Chem. **32**, 59.

von Leucin in Amylalkohol unabhängig von der Gärung durch abbauende Enzyme statthaben kann. Alle diese Versuche waren vollendet, ehe Ehrlich[1]) neuerdings andeutete, daß die Überführung von Aminosäuren in Alkohol durch aufbauende Enzyme erfolge.

Untersuchung der Selbstvergärungsprodukte der Hefe auf Fuselöl.

Schon Lintner[2]) nimmt an, daß die Selbstvergärung eine Quelle für das Auftreten höherer Alkohole im Rohspiritus bildet. Weiter sagt er: „Es ist jedenfalls viel wahrscheinlicher, daß die höheren Alkohole, besonders die Gärungsamylalkohole, der Hefe ihre Entstehung verdanken, als Nebengärungen, welche durch Spaltpilze hervorgerufen werden. Auch Brefeld[3]), Klöcker[4]) und Effront[5]) beobachteten Fuselölbildung bei der Selbstvergärung oder beim Absterben der Hefe. —

Um diese Beobachtungen nachzuprüfen, wurde Preßhefe, die 3,0% Stickstoff in ihrer Trockensubstanz und 70,63% resp. 69,27% Trockensubstanz enthielt, zu je 1 kg mit 2 l Wasser der Selbstvergärung überlassen. Der Zusatz von Chloroform als infektionshinderndes Mittel war ausgeschlossen. Erstens sollte die Hefe nicht gleich abgetötet werden und dann durfte wegen der vorzunehmenden Alkohol- und Fuselbestimmung kein flüchtiger Körper zugegeben werden. Deshalb wurde in zwei verschiedenen Versuchen einmal ¼% Buttersäure, ein andermal 1% Milchsäure zugesetzt, die nach Wehmer[6]) die Gärung nur schwach und die Entwicklung von Fremdorganismen stark hemmen.

Bei diesen Selbstvergärungen wurde innerhalb weniger Tage im ersten Falle 38 g, im zweiten 37 g Kohlensäure abgegeben. Dann wurde der gebildete Alkohol abdestilliert und sein Fuselölgehalt bestimmt. Der in Gegenwart von Buttersäure erhaltene

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 4072. 1906.

[2]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **5**, 793. 1899.

[3]) Nach Märker-Delbrück, Handb. f. Spiritus-Fabrikation. Berlin, Paul Parey. **1903**, 495.

[4]) Alb. Klöcker, Die Gärungsorganismen. Max. Waag, Stuttgart. **1900**, 180.

[5]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 469. 1905.

[6]) Kochs Jahresbericht **9**, 111. 1898 und **12**, 191. 1901.

Alkohol enthielt 1,15 %, der in Gegenwart von Milchsäure gebildete 1,34 % Fuselöl. Die Menge des gebildeten Alkohols bezogen auf die große Menge der selbstvergorenen Hefe war gering. Nur durch die geringe Quantität des bei der Glykogengärung gebildeten Alkohols erklärt sich dessen hoher Prozentgehalt an Fuselöl. —

Die Vergärung von Zucker mit Hefeselbstverdauungsprodukten als Stickstoffquelle.

Die mit $^1/_4$ % Buttersäure selbstvergorene Hefe wurde von der Verdauungsflüssigkeit durch Filtration getrennt und diese auf 3 l aufgefüllt. Nachdem sie mit 10 % Zucker versetzt und steril gemacht war, wurde mit Weinhefe beimpft und vom 16. November bis 7. Dezember vergoren. — Der so erhaltene Alkohol wurde abdestilliert und analysiert. Er enthielt nur 0,16 % Fuselöl.

Die Zeit der Selbstvergärung war in vorstehendem Falle nur kurz gewesen; auch war die Hefe nicht von vornherein abgetötet. Beides wurde in dem neuen Versuche anders angestellt. Weitere 2 kg derselben Preßhefe wurden unter 4 l Chloroformwasser während $2^1/_2$ Monaten einer regulären Selbstverdauung überlassen. Sie verloren dabei bei 28° C 65 g Kohlensäure. Die klar überstehende Flüssigkeit enthielt, nachdem das Chloroform zusammen mit dem Alkohol abdestilliert worden war, 0,785 % Stickstoff.

500 ccm dieser Lösung wurden mit 5 % Zucker steril gemacht. 1000 cmm wurden auf 500 ccm eingedampft, andere 250 ccm auf 500 ccm aufgefüllt und bei Lösung mit 5 % Zucker sterilisiert. Nachdem die drei Nährlösungen mit Weinhefe beimpft und vergoren waren, wurde aus jeder 250 ccm absterilisiert. Die Resultate sind in der Tabelle XVI vereint. — Der Prozentgehalt des so gebildeten Alkohols an Fuselöl ist gering; es war keine Steigerung gegenüber dem auf einer Aminosaüre-freien Stickstoffquelle erzielten zu beobachten. Die absoluten Mengen waren durch die gesteigerte Stickstoffgabe unter diesen Verhältnissen ziemlich unbeeinflußt gelassen worden. Merkwürdig ist, daß nur bei der geringsten Stickstoffkonzentration eine völlige Vergärung des Zuckers zu erzielen war. Die großen Mengen von Hefeeiweißabbauprodukten müssen in den beiden höheren Konzentrationen hemmend auf die Gärung gewirkt haben.

Tabelle XVI. Vergärung von Zucker mit Hefeselbstverdauungsprodukten als Stickstoffquelle.

Mit Wein-Hefe beimpft.

% Selbstverdauungsstickstoff	500 ccm 250 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	g Fuselöl in 50 ccm Dest.	% Alkohol des Destillates			
	bestimmt		berechnet		
1,57	0,0087	3,99	0,0087	1,99	0,437
0,785	0,0078	3,87	0,0078	1,93	0,404
0,393	0,0089	5,08	0,0089	2,54	0,350

Immerhin ließ sich noch der Einwand erheben, daß die stickstoffarme Preßhefe kein gut entwickeltes Verdauungsenzym enthielt und ihre Verdauungsprodukte deshalb arm an Aminosäuren waren.

Deshalb wurde in Würze herangezogene Hefe der Selbstverdauung überlassen. Einerseits wurden 500 ccm Chloroformwasserhefeaufschwemmung während eines Monats allein, andererseits 250 ccm derselben Aufschwemmung in Gegenwart von Pepton während derselben Zeit und bei derselben Temperatur (28° C.) verdaut. Nach dem Abdestillieren des Chloroforms wurden die 250 ccm mit 10% Zucker sterilisiert. Die 500 ccm wurden in zwei Teile geteilt und der eine mit reichlich Pepton und 10% Zucker, der andere nur mit 10% Zucker steril gemacht.

Nach der Vergärung durch eingeimpfte Weinhefe wurden 250 ccm abdestilliert und Alkohol wie Fuselöl bestimmt. Der Peptonzusatz war gemacht worden, um der selbstverdauenden Hefe Gelegenheit zu geben auch dieses in tiefere Eiweißspaltungsprodukte zu verwandeln[1]). Der Peptonzusatz vor der Gärung wurde gemacht, um mit den vorherigen gleiche Verhältnisse herzustellen, falls das Pepton durch die selbstverdauende Hefe nicht angegriffen worden war.

Die in Tabelle XVII zusammengestellten Resultate zeigen, daß bei Abwesenheit von Pepton wieder ein Fuselölgehalt des Al-

[1]) Bokorny, Chemiker-Ztg. **27**, 5. 1903 fand, daß bei Zusatz von Eiweißstoffen zu selbstverflüssigender Hefe auch diese noch in Albumosen und Peptone umgewandelt werden.

kohols erzielt worden war, der den vorherigen Resultaten bei der stickstoffärmeren Hefe entsprach. Bei Peptonzusatz wurde in beiden Fällen gesteigerte Fuselölbildung beobachtet. Wurde das Pepton zu verdauender Hefeaufschwemmung gegeben, so bildete sich weniger Fuselöl, als wenn es der Nährflüssigkeit erst bei der Sterilisation zugesetzt wurde. Die Alkoholbildung war eine unvollkommene, was durch die großen Stickstoffmengen in der Nährlösung im Anschluß an die in Teil II besprochenen Versuche von Iwanowski zu erklären ist.

Weiterhin wurde das sich im Handel findende Hefeverdauungsprodukt Ovos, das in 100 ccm 4,1 g Stickstoff enthielt, in 10 %iger Zuckerlösung mit einem Stickstoffgehalt von 0,4 % mit Weinhefe als Stickstoffquelle benutzt und das Resultat der Tabelle XVII unten beigefügt. Auch damit wurde nur ein niedriger Fuselölgehalt des gebildeten Alkohols erzielt.

Tabelle XVII. Vergärung von Zucker mit Hefeselbstverdauungsprodukten als Stickstoffquelle.

Mit Wein-Hefe beimpft.

	500 ccm 250 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
	bestimmt		berechnet		
Ohne Pepton	0,0205	8,21	0,0205	4,11	0,499
Mit Pepton vergoren	0,0277	8,35	0,0277	4,18	0,663
Mit Pepton verdaut .	0,0252	8,28	0,0252	4,14	0,609
Ovos	0,0101	7,80	0,0101	3,90	0,259

Die so gewonnenen Resultate lassen sich also dahin zusammenfassen, daß bei der Zuckergärung mit Hefeselbstverdauungsprodukten als Stickstoffquelle kein hoher Prozentgehalt des gebildeten Alkohol an Fuselöl zu erzielen war.

Trotz der großen Mengen von Stickstoff, die in den Nährlösungen vorhanden waren, wurde kein gleichhoher Fuselölgehalt wie in Gegenwart von Pepton oder wie auf andern reichlich vor-

handenen Stickstoffquellen z. B. Asparagin, schwefelsaurem Ammoniak und Pepton allein erzielt. Gerade letztere Beobachtung ist schwer zu erklären. Möglicherweise findet die Hefe auf ihren eigenen Verdauungsprodukten hochmolekulare Eiweißspaltungsprodukte für ihren Eiweißaufbau, so daß sie unter so günstigen Bedingungen arbeitend zu keinem bedeutenden Stickstoffumsatz angeregt wird.

Auch der Fuselölgehalt, welcher sich auf Kombinationen von Leucin und andern Stickstoffquellen durch die Hefe erzielen ließ, wurde nie erreicht, wenn Verdauungsprodukte als Stickstoffquelle geboten wurden. Nimmt man nun an, daß die mit Verdauungsprodukten angestellten Versuche einigermaßen den Verhältnissen einer natürlichen Gärung entsprechen, bei der Hefezerfall während der Gärung stattfindet, so bieten die Resultate eine gewisse Erklärung für die Tatsache, daß in der Praxis keine allzugroßen Schwankungen für die Fuselölbildung beobachtet wurden, da auch in vorstehenden Versuchen ein Hinausgehen über ein gewisses Maximum der Fuselölbildung nicht beobachtet werden konnte.

Die Überführung von Leucin in Amylalkohol durch selbstverdauende Hefe?

Durch den Nachweis nur geringer Mengen Fuselöl im Selbstvergärungsalkohol war noch nicht klargestellt, ob nichtwachsender Hefe unter Ausschluß der Alkoholgärung die Fähigkeit zukommt oder abgeht, Leucin enzymatisch in Amylalkohol überzuführen? Denn einerseits konnten der Hefe aus ihrem eigenen Eiweißzerfall nur geringe Aminosäurenmengen zur Verfügung gestanden haben, andererseits wirkte die Hefe durch die Vergärung ihres Glykogen auch alkoholbildend.

Ein klares Versuchsbild ergibt sich, wenn man Leucin einer nicht bedeutenden Hefemenge, der also nur wenig Glykogen zur Gärentfaltung zur Verfügung steht, zur Einwirkung überläßt. Um kräftige Enzymentwicklung zu erreichen, wurde eine stickstoffreiche Hefe herangezüchtet und zu diesem Zweck 1 $^{1}/_{2}$ l ungehopfte Bierwürze unter sterilen Bedingungen mit Logos-Hefe beimpft. Nach vier Tagen wurde die alkoholische Flüssigkeit vom Hefesatz abgegossen, die Hefe gut mit Eiswasser gewaschen und mit 5 g

Leucin aus Melasserückständen in 500 ccm Chloroformwasser der Selbstverdauung bei 28° C überlassen. Nach 38 Tagen wurden 150 ccm abdestilliert.

Alkohol konnte im Destillat durch Gewichtsbestimmung nicht nachgewiesen werden. Auch Fuselöl wurde nicht gefunden, oder seine Menge lag wenigstens bei einer Titration von 0,4 ccm der verwandten Permanganatlösung, die 0,0004 g Amylalkohol für die Gesamtmenge der 150 ccm Destillat entsprechen würden, völlig innerhalb des Versuchsfehlers der Methode.

Durch diesen Versuch wurde also bewiesen, daß **Hefe, die keine Gärkraft zu entfalten Gelegenheit hat und die nicht wächst, auch keine enzymatische Überführung von Leucin in Amylalkohol besorgt.**

Die Überführung des Leucin in Amylalkohol durch wachsende, aber nicht gärende Hefe.

Das Gegenstück zu dem Versuche, in welchem nicht gärender und nicht wachsender, abgetöteter Hefe, d. h. also ihren Abbauenzymen Leucin geboten wurde, bildet ein anderer, bei dem wachsender Hefe, die durch die Abwesenheit von Zucker am gären gehindert und mit einer anderen Kohlenstoffquelle versorgt wurde, mit Leucin als Stickstoffquelle ernährt wurde.

Bekanntlich kann man Hefe in Abwesenheit von Zucker zum Wachstum bringen, wenn man ihr neben einer Stickstoffquelle und Nährsalzen eine andere Kohlenstoffnahrung zur Verfügung stellt. Von den von Laurent[1]) zu diesem Zwecke möglich befundenen Kohlenstoffquellen wurden vier, die Weinsäure, die Äpfelsäure, die Bernsteinsäure und die Zitronensäure ausgewählt und in einem Versuch entschieden, welche zum Wachstum der größtmöglichen Hefezahl am geeignetsten ist. Als Stickstoffquelle wurde Leucin verwandt und zum Vergleich die Hefezahl, welche durch eine ebenso große Stickstoffkonzentration als schwefelsaures Ammoniak erzielt wird, herangezogen.

Die untersuchten Lösungen enthielten die Salze in der schon früher verwandten Zusammensetzung, die Kohlenstoffquellen in 1%igem Gehalt und 0,25 g Leucin oder 0,471 g $(NH_4)_2SO_4$ für

[1]) Ann. Soc. belge de Microscopie **14**, 29. 1890; zitiert nach Lafar. Handbuch der technischen Mykologie Bd. 4 1, S. 93.

100 ccm Lösung. Vor der Sterilisation wurden die Säuren bis zur schwachsauren Reaktion mit Soda neutralisiert. Die eingeimpfte Hefe war Logos-Hefe.

Die folgende Tabelle enthält die Zahl der nach zwei Monaten gefundenen Hefezellen pro ccm.

	$(NH_4)_2SO_4$	Leucin
Weinsäure . . .	4000	keine
Äpfelsäure . . .	1,1 Millionen	14,6 Millionen gut aussehender Zellen
Bernsteinsäure . .	5,4 Millionen gut aussehender Zellen	11,7 Millionen
Zitronensäure . .	5000	13200

Bei dem langsamen Wachstum der Hefe in solchen Nährlösungen müssen zur Zeit der Probenahme für die Zählung schon eine gewisse Anzahl Zellen tot gewesen sein, was nicht zu vermeiden ist. Immerhin konnte eine im Verhältnis zur Zuckernährung gar nicht so geringe Anzahl Hefezellen für die Volumeneinheit erzielt werden.

Mit Leucin kommt man zu einer größeren Hefezahl als mit schwefelsaurem Ammoniak, wobei aber zu berücksichtigen ist, daß die Hefe aus dem Leucin auch den Kohlenstoffbedarf entnommen haben kann, da sie, wie ich mich überzeugt habe, auch mit Leucin als gemeinsame Kohlen- und Stickstoffquelle zum Wachstum kommt.

Die sich für meinen Zweck am besten eignenden Kohlenstoffquellen waren Bernsteinsäure und Äpfelsäure.

1,5 Liter einer nach vorher beschriebenen Vorschrift hergestellten Leucin-Bernsteinsäurelösung wurde mit Logos-Hefe beimpft und davon nach einem Monat 100 ccm abdestilliert. 50 ccm des Destillates gaben einer Titration von 1,75 ccm des verwandten Permanganats entsprechend für 100 ccm, d. h. der dem 1,5 Liter Lösung entsprechenden Menge 0,0050 g Amylalkohol. Die Menge des gebildeten Amylalkohols scheint gering. Sie liegt aber innerhalb des Versuchsfehlers, wenn man berücksichtigt, daß die ausgeschüttelte Lösung gar keinen Alkohol enthielt, so daß dieser der Veresterung hätte anheim fallen können.

1 Liter der nach demselben Rezept zusammengestellten Leucin-Äpfelsäurelösung wurde mit Logos-Hefe beimpft und dieser fünf Monate Zeit zum Wachstum geboten. Bei der Destillation, bei der sich ein schwacher Amylestergeruch bemerkbar machte, wurden 50 ccm gesammelt. Bei der Titration wurden nur 0,8 ccm der Permanganatlösung entsprechend 0,0003 g Amylalkohol entfärbt. Dieses Resultat liegt ganz innerhalb der Versuchsfehler.

Zieht man in Betracht, daß die zum Hefewachstum verwandten Flüssigkeitsvolumina reichlich groß gewählt worden waren, so kommt man zu dem Schluß, daß größere Fuselölmengen hätten gefunden werden müssen, wenn durch den Eiweißaufbau der an der Gärung gehinderten Hefe eine Überführung der gebotenen Stickstoffquelle in Amyalkohol stattgefunden hätte. Immerhin deutet das auf Bernsteinsäure erzielte Resultat wie der bei der Äpfelsäurekultur sich merkbar machende Geruch darauf hin, daß man den Versuchen, welche vor mehreren Monaten angestellt wurden, keine absolute Beweiskraft im negativen Sinne zusprechen darf. Möglicherweise läßt sich hier mit einer anderen Kohlenstoffquelle noch ein positives Resultat der Überführung von Leucin in Amylalkohol durch wachsende, aber nicht gärende Hefe erzielen.

Über die Bildung von Fuselöl bei Acetondauerhefegärung.

Nachdem einerseits gezeigt worden war, daß durch Chloroform abgetötete Hefe, in Abwesenheit von vergärbarem Zucker, nicht imstande ist, durch überlebende Enzyme Leucin in Amylalkohol zu verwandeln und andererseits auch durch Wachstum von Hefe mit Leucin als Stickstoffquelle, unter Ausschluß der Gärung durch Verwendung einer nicht vergärbaren Kohlenstoffquelle, keine faßbare Überführung der Aminosäure in den Alkohol erreicht wurde, interessierte es zu erfahren, ob Zymase oder andere überlebende Enzyme bei gleichzeitiger Zuckergärung die Umwandlung besorgen? Zur Entscheidung der Frage wurde die Acetondauerhefegärung verwandt. Theoretisch muß hier hervorgehoben werden, daß die so abgetötete Hefe, trotzdem ihre Zymase und eine Reihe anderer ihrer Enzyme noch am Leben sind, keinen Stickstoffumsatz im Sinne des im zweiten Teil erläuterten Wechselspiels von Stickstoffaufnahme und -Abgabe während der Gärung mehr erleidet. Da, wie früher hervorgehoben, die Umwand-

lung von Leucin in Amylalkohol an diesen Stickstoffumsatz gebunden ist, so ist es nur natürlich, daß bei der Acetondauerhefegärung keinesolche Überführung zu erreichen war.

Das experimentelle Ergebnis der mit Acetondauerhefe in Gegenwart von Leucin bei der Gärung angestellten Versuche wurde schon früher mitgeteilt,[1]) weil Buchner und Meisenheimer[2]) mit einer Veröffentlichung hervortraten, in der sie bewiesen, daß bei der Vergärung von Rohrzucker durch Hefepreßsaft nur äußerst geringe Mengen Fuselöl gebildet werden. Diese Herren stellen einen weiteren Versuch in Aussicht, bei welchem sie der zellfreien Gärung Leucin zusetzen wollen. Das Resultat wird wohl von dem mit Acetondauerhefe gewonnenen nicht abweichen. Auch geben schon Abderhalden und Schittenhelm[3]) an, daß durch Preßsaft eine Spaltung racemischer Aminosäuren in optisch aktive Komponenten nicht zu erreichen ist.

Inzwischen hat noch F. Ehrlich[4]) meine Beobachtung über die Nichtüberführbarkeit von Leucin in Amylalkohol durch Acetondauerhefegärung durch die Veröffentlichung von Resultaten bestätigt, die er auf andere Weise wie ich schon früher gewonnen hatte[5]).

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 3713. 1906.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 3208. 1906.

[3]) Ztschr. f. physiol. Chem. **49**, 27. 1906.

[4]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 4072. 1906.

[5]) Herr Ehrlich beschwert sich bei dieser Gelegenheit, daß ich seiner bereits früher ausgeführten Versuche keine Erwähnung getan habe. Ich freue mich sein Vorrecht auf die frühere Anstellung der Versuche noch nachträglich anerkennen zu können, trotzdem er sie erst später wie ich veröffentlicht hat. Denn die Bemerkung, auf welche sich Herrn Ehrlichs Beschwerde stützt, lautet wörtlich folgendermaßen*): Bei der Einfachheit der chemischen Reaktion (nämlich der Fuselölbildung aus Aminosäuren), die in einer bloßen Wasseranlagerung besteht, liegt ja in Analogie ähnlicher hydratisierender Fermentwirkungen die Annahme nahe, daß auch bei der Vergärung von Leucin zu Amylalkohol ein oder mehrere Enzyme die Hauptrolle spielen. Versuche, die Existenz eines solchen mit Hilfe der Buchnerschen Acetondauerhefe zu beweisen, die ich im übrigen noch nicht für abgeschlossen betrachten möchte, verliefen zwar bisher resultatlos, usw.“ Über die Art der Versuchsanstellung oder irgend welche näheren Resul-

*) Diese Ztschr. **2**, 77. 1906.

Der Einfluß des Säuregrades und der Säureabstumpfung auf die Menge des bei der Gärung gebildeten Fuselöls.

Der Einfluß des Säuregrades auf die bei der Gärung gebildete Menge Fuselöl ist besonders im Zusammenhang mit der Frage zu besprechen, ob die Anwesenheit von Mikroorganismen anderer Art die Fuselölbildung heraufsetzen kann, auch wenn letztere selbst keine höheren Alkohole bilden. Handelt es sich um säurebildende Bakterien, so kann erwogen werden, ob die Säure- oder andere Stoffwechselprodukte dieser die Lebenstätigkeit der Hefe hemmen und dadurch bei einer größeren Zahl absterbender Zellen mehr Eiweißspaltungsprodukte in die Gärflüssigkeit kommen.

Um diesen Fragen näher zutreten, mußte durch den Versuch entschieden werden, wie die Gegenwart von Säure, wozu im Anschluß an die Praxis 1 %ige Milchsäure verwandt wurde, der natürliche Säuregrad der Würze zusammen mit den während der Gärung gebildeten Säuren oder eine Abstumpfung aller Säuren durch Gegenwart von kohlensaurem Kalk auf die Bildung von Fuselöl durch Hefereinkultur wirkt.

Im Zusammenhang mit den angestellten Betrachtungen sind ein paar Literaturangaben von Interesse.

Alkalische Reaktion der Flüssigkeit schwächt nach Delbrück[1]) die Gärung, welche in einer auch nur einigermaßen stark alkalischen Flüssigkeit überhaupt nicht mehr eintritt. Lindet[2]) stellt andererseits fest, daß aus säurearmen Mosten bei der Gärung mehr Fuselöl gebildet wird als aus säurereichen.

Aus diesen Angaben wäre also der Schluß zu ziehen, daß Säuren, die Fuselölbildung nicht steigern, alkalische Reaktion der Gärflüssigkeit oder auch dauernde Säureabstumpfung die Bildung von Fuselöl heraufsetzt.

Die folgenden Experimente beweisen die Richtigkeit dieser Schlußfolgerungen. Die Art der Versuchsanstellung ist aus der Tabelle XVIII zu entnehmen. Wie man aus den Resultaten er-

---

tate ist hier also nichts angegeben, so daß auch die Annahme Herrn Ehrlichs, ich hätte seinen, mir vor dem 29. Oktober 1906 zugesandten Separatabdruck nicht gelesen, gegenstandslos wird.

[1]) Märker-Delbrück, Handbuch der Spiritusfabrikation 493.

[2]) Compt. rend. **117**, 122. 1893.

sieht, wurde durch die mit der Gegenwart von kohlensaurem Kalk verbundene Säureabstumpfung der Fuselölgehalt des gebildeten Alkohols heraufgesetzt. Mit 1 % Milchsäure entstand ein fuselärmerer Alkohol als ohne den Zusatz einer Säure. Doch ist mit diesem Resultat zusammen zu beachten, daß diese Säuremenge doch stärker hemmend auf die Gärung oder wenigstens das Wachstum der minimal eingesäten Frohberg-Hefe gewirkt hätte, als sich das erwarten ließ.

Tabelle XVIII. Einfluß des Säuregrades und der Säureabstumpfung.

Bierwürze beimpft mit Frohberg-Hefe.

Zusatz von	Länge der Gärzeit	250 ccm 250 ccm Destillat: g Fuselöl in 50 ccm Destillat	250 ccm 250 ccm Destillat: %Alkohol des Destillates	% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	%Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	Tage	bestimmt		berechnet		
—	7	0,0097	6,86	0,0194	6,86	0,283
$CaCO_3$	13	0,0108	6,10	0,0216	6,10	0,354
		250 ccm 100 ccm Destillat				
1 % Milchsäure	17	0,0076	9,13	0,0061	3,65	0,167

Aus den Beobachtungen über die Herabsetzung der Fuselölbildung durch Säuren darf noch nicht der Schluß gezogen werden, daß die Angaben, welche in der Praxis häufig gemacht wurden und welche dahin gehen, daß bei unreiner Gärung mehr Fuselöl entsteht als bei reiner, falsch sind. Denn selbst wenn sich in unreinen Gärungen durch die gleichzeitige Entwicklung von z. B. Buttersäurebakterien, um die es sich der Resistenz ihrer Sporen wegen in solchen Fällen ja meist handeln wird, Säuren entwickeln, so wirken diese nur neben dem sonstigen ungünstigen Einfluß solcher Bakterien auf die Hefe. Denn Delbrück sagt (a. a. O. 492): die Hefe scheint besonders zu leiden, wenn die Bakterien der Buttersäuregärung anwesend sind, vielleicht weil diese geringe Mengen Stoffe ausscheiden, die der Analyse entgehen, aber von Einwirkung auf die Hefezelle sind.

Der Einfluß der Temperatur auf die Menge des gebildeten Fuselöls.

Aus der Beobachtung, daß höhere Temperatur stärkeren Zerfall des Hefeeiweiß mit sich bringt (Märker-Delbrück p. 545), weil es zu stärkerem Angriff des Hefeeiweiß durch die Enzyme kommt (ebda. 619), ließ sich von vornherein schlußfolgernd, daß höhere Gärtemperatur auch stärkere Fuselölbildung zur Folge haben würde. Die wenigen Angaben der Literatur, welche ich darüber finden konnte, bestätigen diese Annahme. Lebel[1]) beobachtete, daß Bier, welches im sehr kühlen Keller dargestellt wurde, nur sehr wenig Amylalkohol enthielt, und Chapman[2]) fand, daß bei der Biergärung um so mehr Fuselöl gebildet wird, je höher die Temperatur ist.

Die in Tabelle XIX zusammengestellten Resultate stellen diese Beobachtungen auf eine neue experimentelle Grundlage. Sie wurden in engsten Anschluß an die Praxis zuerst mit einer in Betrieb mit Hefe angestellten Brennereimaische unternommen und später durch zwei andere ergänzt, in der dieselben steril gemachten Maischen mit derselben aber zu diesem Zwecke von mir in Reinkultur gewonnenen Hefe vergoren wurden. In beiden Fällen nahm die absolute Menge des gebildeten Fuselöls sowohl wie die auf Alkohol bezogene Menge mit wachsender Temperatur zu.

Die Quantität des nach der Gärung vorgefundenen Alkohols wurde in der Nichtreinkulturgärung durch die Anwesenheit von Essigbakterien stark beeinflußt, die bei höherer Temperatur zur stärkeren Entfaltung und gärhemmenden Wirkung gelangen. Daß auf ihre Anwesenheit die geringe Alkoholbildung zurückzuführen ist, geht klar daraus hervor, daß in der 35 Tage lang bei 25° C. gehaltenen Gärung so gut wie aller Alkohol verzehrt worden war.

In den mit Reinkultur angestellten Gärungen wurde bei der höheren Temperatur der Hefe in einer zweitägigen Periode erst gute Entwicklungsgelegenheit bei 23° geboten, ehe sie die Vergärung des Zuckers bei höherer Temperatur zu vollziehen gezwungen wurde. Hier wurde nun bei höherer Temperatur nach Ausschaltung aller Nebenwirkungen durch die Reinkultur nicht nur mehr Fuselöl, sondern auch mehr Alkohol erhalten.

---

[1]) Bull. de la Soc. chim. de Paris **2**, 98. 1882.

[2]) Journal of the Federated Institutes of Brewing **3**, 240. 1897.

Tabelle XIX. Einfluß der Temperatur.

Maische aus der Weender Brennerei,
dort mit Hefe angestellt.

Gärtemperatur	Länge der Gärzeit	250 ccm 150 ccm Destillat: Fuselöl in 50 ccm Destillat	250 ccm 150 ccm Destillat: $^0/_0$ Alkohol des Destillates	$^0/_0$ Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	$^0/_0$ Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	$^0/_0$ Fuselöl des Alkohols
° C.	Tage	bestimmt		berechnet		
Kellertemp.	5	0,0139	6,66	0,0167	4,00	0,417
25	5	0,0172	5,08	0,0206	3,05	0,675
38	5	0,0178	4,13	0,0214	2,48	0,863
25	35	0,0133	0,11	—	—	—
Dieselbe Maische steril mit Brennereihefereinkultur beimpft.						
15	10	0,0291	6,53	0,0349	3,92	0,890
23 33	2 4	0,0343	8,51	0,0412	5,11	0,802

Summiert man die Resultate, so kommt man zu dem Schluß, daß bei höherer Temperatur der Gärung mehr Fuselöl als bei niederer gebildet wird.

Wichtig ist noch darauf hinzudeuten, daß der Prozentgehalt des Alkohols an Fuselöl bei der Nichtreinkulturgärung den der Reinkulturgärung nicht übertraf, so daß noch besonders gezeigt wurde, wie wenig man die Windischen Resultate, welche im historischen Teil angegeben wurden, verallgemeinern darf. In seinem Fall war eben die höhere Fuselölbildung bei der spontanen Vergärung auf eine Lebensschwächung der verwandten Hefe durch die gleichzeitige Entwicklung von Fremdorganismen zurückzuführen.

Der Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Menge des gebildeten Fuselöls.

Über den Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Bildung von Fuselöl finden sich keine Angaben in der Literatur. Es ist dies auch nicht zu verwundern, denn er ist nur ein wenig ausgeprägter.

Zur experimentellen Prüfung wurde der Alkohol aus den vier Gärgefäßen, die im Anhang zur Untersuchung des Gärverlaufs mit

verschiedener Zuckerkonzentration benutzt worden waren, zu einer Zeit abdestilliert, als der Gewichtsverlust der drei mit Zucker versetzten Flaschen dem der völligen Vergärung bei der reinen Würze gleichgekommen war. Auf diese Weise wurde in allen Fällen dieselbe Alkoholkonzentration, auf die die Fuselölkonzentration bezogen werden sollte, erzielt. Sie war etwa 7,2 bis 7,5 %.

Die in der Tabelle XX vereinten Resultate zeigen, daß die Menge des gebildeten Fuselöls in der reinen Würze am höchsten war, daß also der Zuckerzusatz mit einer Beschleunigung des Gärverlaufes, wie im Anhang angegeben, auch eine Verminderung der Fuselölbildung zur Folge hatte. Aber auch hier ist der Einfluß kein ausgeprägter. — Darf man den Analysenzahlen bis in das Bereich ihrer Fehlergrenze hinein trauen, wie man durch den logischen Zusammenhang zwischen erhöhter Zuckerkonzentration und Erschwerung des Hefelebens von der optimalen bei 25 % Zucker an verlockt wird, so findet man von dieser nach aufwärts wieder eine Zunahme an gebildetem Fuselöl mit wachsender Konzentration des Zuckers. Sie ist jedoch sehr gering.

Tabelle XX. Verschiedene Zuckerkonzentration.
Würze mit Zuckerzusatz.
Mit Logos-Hefe beimpft.

Länge der Gärzeit	g Zucker in 250 ccm der ursprünglichen Würze	Zusatz g Zucker zu 250 ccm Würze	150 ccm Destillat: g Fuselöl in 50 ccm Destillat	150 ccm Destillat: %Alkohol des Destillates	% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
Tage	bestimmt	abgewogen	bestimmt		berechnet		
22	38	0	0,0204	12,42	0,0245	7,45	0,33
9 Tage mit stärkster Angärung		25	0,0158	12,27	0,0190	7,36	0,26
6		50	0,0169	12,50	0,0203	7,50	0,27
6		75	0,0179	12,03	0,0215	7,22	0,29

Wie schon zuerst gesagt, ist der **Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Fuselölbildung** — wenigstens in meinen Versuchen — **kein ausgeprägter.**

Der Einfluß verschiedener Hefearten auf die Menge des gebildeten Fuselöls.

Aus der Abweichung der Lebenstätigkeit verschiedener Hefearten voneinander ließ sich von vornherein annehmen, daß auch die Fuselölbildung durch sie mannigfaltig beeinflußt wird. Man kann deshalb nicht davon sprechen, daß eine Hefeart mehr Fuselöl als eine andere bildet, sondern man muß das immer auf bestimmte Lebensbedingung einer Hefe beziehen. So bildet z. B. Frohberg-Hefe mit Pepton als Stickstoffquelle unter sonst gleichen Bedingungen weniger Fuselöl als Logos-Hefe, während sich auf Bierwürze das Verhältnis umkehrt. Ebenso entsteht mit Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak als Stickstoffnahrung durch Weinhefe mehr Fuselöl als durch Logos-Hefe, auf Würze dagegen durch Logos-Hefe mehr als durch Weinhefe. Auf derselben Würze ordnen sich die Hefen bei sonst ganz gleichen Bedingungen in der Intensität ihrer Fuselölbildung wie Saaz-, Wein-, Logos- und Frohberg-Hefe an. Der Einfluß verschiedener Hefe auf die Menge des gebildeten Fuselöls kann ein ziemlich bedeutender sein. Frohberg-Hefe bildete fast doppelt soviel Fuselöl als Saaz-Hefe. Da er noch von so verschiedenen anderen Ursachen, wie Temperatur, Länge der Gärzeit und besonders der ursprünglichen Zusammensetzung der Nährlösung abhängig ist, zweifle ich, ob im praktischen Betriebe die Auswahl einer Hefesorte durch die Menge Fuselöl, welche sie unter den Normalverhältnissen bildet, beeinflußt werden soll. Jedenfalls darf keine Hefe als besonders wenig Fuselöl bildend angepriesen werden. Das muß für jeden einzelnen Fall und besonders mit Verwendung der Betriebsmaische nachgeprüft werden. Mehr läßt sich aus den von mir gewonnenen Resultaten nicht schlußfolgern. Es muß deshalb einer mehr auf praktische Resultate gerichteten Arbeit überlassen bleiben hier eingehende Ermittelungen anzustellen. Ich selbst werde mich diesem Thema nicht zuwenden.

Die mit Pepton, Asparagin und sehwefelsaurem Ammoniak gewonnenen Resultate stützen sich auf die Analysen, welche sich in dem Teil der Arbeit finden, der speziell von der Bildung des Fuselöls auf diesen Stickstoffquellen handelt. Die Resultate mit Frohberg- und Logos-Hefe auf Würze wurden im Abschnitt „Einfluß der Gärdauer auf die Menge des gebildeten Fuselöls“ unter

sonst gleichen Gärbedingungen gewonnen und durch neue Analysen bestätigt wie durch Gärungen mit Saaz- und Weinhefe ergänzt, welche sich in der Tabelle XXI finden.

Tabelle XXI. Einfluß verschiedener Hefearten.

Art der Hefe	Länge der Gärzeit	250 ccm 100 ccm Destillat: g Fuselöl in 50 ccm Destillat	250 ccm 100 ccm Destillat: % Alkohol des Destillates	% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
	Tage	bestimmt		berechnet		
Saaz-H.	8	0,0090	11,65	0,0072	4,66	0,155
Wein-H.	7	0,0098	11,42	0,0078	4,57	0,171
Logos-H.	7	0,0176	16,47	0,0141	6,59	0,214
		250 ccm Destillat				
Frohberg-H.	7	0,0097	6,86	0,0194	6,86	0,283

Die Resultate sind jedoch wegen der geringen Werte, welche für Fuselöl gefunden wurden, mit einiger Vorsicht aufzunehmen. Die Übereinstimmung zwischen den früheren Resultaten (Tabelle XIII) und den neuen (Tabelle XXI) ist folgende: Für Frohberg-Hefe % Fuselöl des gebildeten Alkohols 0,28 % zu 6,86 % Alkohol und 0,281 % zu 6,86 % Alkohol. Für Logos-Hefe 0,19 % zu 5,60 % Alkohol und 0,22 % zu 6,59 % Alkohol. Die Genauigkeit der Resultate reicht für die Schlüsse, die ich aus ihnen gezogen habe, aber nur für diese, aus. —

Der Einfluß der künstlichen Stickstoffvermehrung einer Maische auf die Menge des gebildeten Fuselöls.

Nachdem durch so viele Resultate der Beweis geführt war, daß der Stickstoffgehalt einer Gärflüssigkeit auf die Menge des gebildeten Fuselöls von Einfluß ist, schien es ratsam, diese Beobachtung für einen Versuch auszunutzen, der der Praxis dienen könnte. Besonders der Befund, daß sich bei geringem Stickstoffgehalt die während der Gärung gebildete Fuselölmenge im Vergleich zu der bei höherer Stickstoffgabe steigern kann, ließ die Frage einer experimentellen Prüfung benötigen, ob durch die künstliche Vermehrung des Stickstoffgehaltes einer Maische ein Rückgang im Fuselölgehalt des gebildeten Alkohols zu erzielen

sei? Zu dieser Prüfung wurde absichtlich die billigste Stickstoffquelle für Hefe, welche uns die chemische Technik liefert, nämlich das schwefelsaure Ammoniak verwandt, weil die Verwendbarkeit einer Methode, mit deren Hilfe die Fuselölbildung bei der Gärung zugunsten der bequemeren Reinigung des Alkohols durch Zusatz einer stickstoffhaltigen Substanz zur Maische herabgesetzt werden soll, vom Preise des Materials abhängig sein muß.

Für die Versuche wurde eine von der Weender Brennerei und Preßhefefabrik gütigst zur Verfügung gestellte Maische und eine Reinkultur der dort benutzten Hefe, die selbst herangezogen wurde, im möglichsten Anschluß an die Praxis verwandt, Der Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak geschah in zwei Konzentrationen. Durch die niedrigere von 0,189 g $(NH_4)_2SO_4$ sollte der in der Maische schon vorhandene Stickstoff optimal für niedrige Fuselölbildung eingestellt werden, weil diese Konzentration allein nach Tabelle X schon unter der optimalen für diesen Zweck liegt. Durch die höhere von 3,026 g $(NH_4)_2SO_4$ war meiner Erwartung nach wieder die Bildung von mehr Fuselöl (wie in Tabelle X) zu erreichen, da durch so hohe Stickstoffgabe in der Nährflüssigkeit die Fuselölbildung wenigstens in Gegenwart nur einer Stickstoffquelle immer heraufgesetzt wird.

Wie die in Tabelle XXII zusammengestellten Resultate zeigen, wurde die allgemeine Annahme, daß sich durch Zusatz assimilierbaren Stickstoffs die Fuselölbildung bei der Vergärung einer natürlichen Maische herabdrücken läßt, vollauf bestätigt. Dagegen war der weitere Schluß über die Steigerung des Fuselölgehaltes durch zu großen Zusatz von Stickstoff zur Nährlösung nicht gerechtfertigt. Selbst bei einer Gabe von 3,026 g $(NH_4)_2SO_4$ pro 250 ccm Maische wurde noch eine weitere Fuselölverminderung gegenüber der bei geringerer Stickstoffvermehrung erzielt. Die Erklärung dieses Resultates muß in der Annahme gefunden werden, daß die Hefe in der Weender Maische nicht zu wenig Stickstoff dagegen aber viel Fuselöl gebende Aminosäuren fand — wie durch die hohe Fuselölbildung aus der reinen Maische wahrscheinlich wird —, und daß durch den Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak eine Schützung der Aminosäuren eintrat. Experimentell war diese Schützung der Aminosäuren vorher ja belegt worden.

Tabelle XXII. Roggenmalzwürze aus der Weender Brennerei mit Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak.

Mit Brennerei-Hefe vergoren.

Temperatur während der Gärung	Zusatz g $(NH_4)_2SO_4$ zu 250 ccm Würze	Zusatz g Stickstoff zu 250 ccm Würze	150 ccm Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
			g Fuselöl in 50 ccm Destillat	% Alkohol des Destillates			
° C.	abgewogen	berechnet	bestimmt		berechnet		
15	0,0	0,0	0,0291	6,53	0,0349	3,92	0,890
	0,189	0,0401	0,0179	7,53	0,0215	4,52	0,475
	3,026	0,642	0,0147	7,53	0,0176	4,52	0,389

Der Möglichkeit, die Fuselölbildung durch den Zusatz von schwefelsaurem Ammon zur Maische herabzusetzen, möchte ich eine gewisse praktische Bedeutung zusprechen, zumal die Alkoholbildung durch die Vermehrung des Stickstoffgehalts der Nährlösung nicht unwesentlich gesteigert wurde. Natürlich müßten die an der einen natürlichen Maische gewonnenen Beobachtungen durch die Verwendung zahlreicher von verschiedener Herkunft verallgemeinert werden, was ich mit Verwertung meiner Versuchsanstellung dem Interesse für das Wohl der Praxis arbeitender Experimentatoren empfehle.

Die Bildung von Fuselöl bei der alkoholischen Gärung durch Schimmelpilze.

Eine reichliche Vergärung von Zuckerlösungen läßt sich außer durch Hefe noch durch Schimmelpilze erreichen. Naturgemäß hat die Frage ein gewisses Interesse, ob der durch solche Pilze gebildete Alkohol auch Fuselöl enthält und ob sein Fuselölgehalt etwa dem durch Hefe gebildeten Alkohol entspricht?

Zur Prüfung dieser Frage wurde eine von Herrn Prof. C. Wehmer übersandte Kultur von Mucor racemosus verwandt[1]). Die unter Watteverschluß vor sich gehende Entwicklung und Gärung verlief genau wie von Wehmer[2]) angegeben. Die Tabelle XXIII enthält die Resultate.

---

[1]) Auch an dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Wehmer meinen Dank aussprechen.

[2]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **14**, 561. 1905.

Tabelle XXIII. Würze.

Mit Mucor racemosus vergoren.

	Gärzeit	150 ccm Destillat: g Fuselöl in 50 ccm Destillat	150 ccm Destillat: %Alkohol des Destillates	% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	%Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
		bestimmt		berechnet		
500 ccm Würze. 20° C.	8. Nov. bis 19. Jan.	0,0144	7,12	0,0086	2,14	0,40
	25. Nov. bis 20. Jan.	0,0158	6,59	0,0095	1,98	0,47

In Übereinstimmung mit Wehmer (a. a. O. 567) wurde die Alkoholgrenze des Pilzes, allerdings bei begrenzter Gärzeit, auf Würze zu etwa 2 Gewichts-Prozent gefunden. Auch Mucor racemosus bildet bei der Alkoholgärung Fuselöl. Der Prozentgehalt des auf Würze gebildeten Alkohols an Fuselöl liegt höher (vergl. Tabelle XXI) als der durch verschiedene Hefesorten gebildete.

Übersicht der Ergebnisse des dritten Teils.

Die Methode von E. Beckmann gibt bei einiger Übung verläßliche Resultate für die quantitative Bestimmung des Fuselöls. Sie dürfte für alle wissenschaftlichen Zwecke und für alle Fuselölbestimmungen, bei denen es auf die Sicherheit der Ergebnisse ankommt, die Rösesche Methode zu ersetzen geeignet sein. —

Der Einfluß der Stickstoffernährung auf die Menge des durch die Hefe während der Gärung gebildeten Fuselöls muß in zwei Betrachtungsweisen gesondert werden. Es handelt sich dabei erstens um die Überführung von fertig gebildeter Aminosäure und zweitens, mit anderen Stickstoffquellen, um die Umwandlung der während der Gärung aus der Hefe austretenden Aminosäuren in Fuselöl. In der Mitte zwischen diesen beiden Möglichkeiten liegt der Fall, daß der Hefe von vornherein neben Aminosäuren, die Fuselöl geben können, andere Stickstoffquellen geboten wurden.

Ist Leucin die einzige Stickstoffquelle für aus minimaler Einsaat herauswachsende Hefe, so nimmt mit steigendem Leucin-

gehalt der Lösung die Menge des im Gärprodukt sich vorfindenden Amylalkohols zu. Sie erreicht aber ein Maximum, das mit Logos-Hefe bei 0,38 g Leucin pro 250 ccm Nährlösung oder bei einem Prozentgehalt von 0,152 % Leucin oder 0,0160 % Stickstoff gefunden wurde. Hier herrscht die erste Analogie mit den im zweiten Teil gewonnenen Resultaten über den Stickstoffumsatz wachsender Hefe während der Gärung, der mit steigender Stickstoffgabe ebenfalls bis zu einem gewissen Maximum zunahm.

Wird nun statt minimaler Aussaat stickstoffarme Preßhefe in großer Menge, die Wachstum ausschloß, verwandt, dann steigert sich die Fuselölbildung bei gleicher Leucinkonzentration der Lösung gegenüber der bei minimaler Aussaat gewonnenen. Hier findet sich die zweite Analogie zwischen Fulselölbildung aus fertig gebildeter Aminosäure und dem Stickstoffumsatz während der Gärung, da sich beide durch Anwendung stickstoffarmer Hefe verstärken. In einem Versuche wurde gefunden, daß stickstoffreiche Hefe in großer Aussaat diese Steigerung der Fuselölbildung nicht zeigt, da sie weniger zum Stickstoffumsatz neigt.

Die dritte Analogie findet sich in der Tatsache, daß sowohl die Fuselölbildung aus ursprünglich vorhandener Aminosäure wie der Stickstoffumsatz während der Gärung im ersten Stadium, dem der reichlichen Hefevermehrung, am größten ist.

Es besteht also ein jetzt gut erwiesener Zusammenhang zwischen dem Stickstoffumsatz während der Gärung, der mit einer Stickstoffaufnahme aus der Gärflüssigkeit durch wachsende oder auch nicht wachsende Hefe, verbunden ist, und der Überführung von Aminosäure in höheren Alkohol[1]).

Berechnet man aus der Menge des gebildeten Fuselöls die Menge des verbrauchten Leucins, so stellt sich heraus, daß nicht nur die natürliche optische Antipode, sondern die ganze Leucinmenge bei geringer Leucinkonzentration angegriffen werden kann. Die Tatsache, daß mehr als die theoretisch der Leucingabe entsprechende Menge Fuselöl am Ende der Gärung bei sehr geringer Leucinkonzentration der Nährlösung erscheint, findet ihre Er-

[1]) Wenn man den Wunsch hat die Konstatierung dieser Tatsache theoretisch zu verallgemeinern, so kann man, wie das Ehrlich tut, von der Überführung von Leucin in Amylalkohol durch — uns noch unbekannte — aufbauende Enzyme sprechen.

klärung in der wiederholten Ausnutzung der während der Gärung aus der Hefe austretenden stickstoffhaltigen Produkte, die zum großen Teil — oder auch ganz — Aminosäuren sein müssen.

Diese wichtige Erscheinung möchte ich zu der durch den Umtrieb und Umsatz ermöglichten tunlichsten Ausnutzung unzureichender Stickstoffmengen durch höhere Pflanzen in Vergleich setzen[1]. Ebenso wie eine Pflanze trotz des Stickstoffhungers noch einige Zeit langsam fortwachsen und neue Blätter, Sprosse usw. produzieren kann, indem die jüngeren Organe den absterbenden älteren Organen einen Teil des Stickstoffs entreißen, wachsen neue Hefezellen in der Nährlösung mit Ausnutzung des Stickstoffs, den die älteren Hefezellen in die Lösung entlassen.

Diese Erscheinung muß auch eine Erklärung dafür sein, daß bei aminosäurefreier Ernährung der Hefe bei geringer Stickstoffgabe unter einer gewissen Grenze mehr Fuselöl gebildet wird als bei höherer, wie das beim Pepton, Asparagin und schwefelsaurem Ammoniak der Fall war. Für diese — und gewiß ähnliche Stickstoffquellen — gibt es ein Optimum für die Bildung der geringsten Fuselmenge, von dem auch nach oben wie nach unten die Fuselölbildung ansteigt. Bei steigender Stickstoffgabe von diesem Optimum an wird das durch gesteigerten Stickstoffumsatz, bei sinkender durch die wiederholte Ausnutzung derselben Stickstoffmenge, die mit einer Ausscheidung von Aminosäuren durch die Hefe in die Nährlösung verbunden sein muß, veranlaßt.

Erklärlicher Weise wird durch die Anwesenheit einer in Fuselöl überführbaren Aminosäure in allen Fällen, auch bei Gegenwart einer anderen Stickstoffquelle, die Bildung des Fuselöls gegenüber der auf Aminosäure-freier Nährlösung heraufgesetzt, andererseits aber auch durch das Vorhandensein anderer Stickstoffquellen bei Gegenwart von solchen Aminosäuren die Fuselölbildung vermindert. Die Beobachtungen stehen zu dem Vorhergesagten in völlig logischem Zusammenhang, weil durch die Anwesenheit einer anderen Stickstoffquelle eine Schützung der Aminosäure einsetzt.

Aus dem Vorhergehenden erklärt sich auch, daß durch Zusatz von assimilierbarem Stickstoff in Form von schwefelsaurem

[1] Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl. **1**, 381.

Ammoniak zu einer natürlichen Maische die Fuselölbildung in dieser herabgesetzt wurde, was durch die Billigkeit der verwandten Stickstoffquelle für die Praxis von Wichtigkeit werden kann. —

Die Beantwortung der Frage nach der Bildung eines Stoffwechselproduktes der Hefe in verschiedenen Stadien der alkoholischen Gärung — also auch der von Glyzerin und Bernsteinsäure — darf nicht abstrakt sondern nur in Beziehung zu bestimmter Nährlösungzusammensetzung gegeben werden[1]. Ist die Verbindung, aus der sich das Nebenprodukt bildet — die für Glyzerin und Bernsteinsäure noch unbekannt ist — ursprünglich in der Nährlösung enthalten, so wird auch die erste Gär- und Wachstumsperiode der Hefe die der intensivsten Stoffwechselproduktbildung sein. So war es bei der Bildung von Fuselöl aus Aminosäure. Wird dagegen die Verbindung, aus der die Stoffwechselprodukte entstehen erst durch die Lebenstätigkeitder Hefe in die Nährlösung entlassen, dann hängt das zeitliche Erscheinen dieser Produkte von der Zeitperiode ab, zu der die Stoffwechselprodukte gebende Verbindung in die Nährlösung kommt. Diese Angabe wird gestützt durch die Beobachtung des innigen Zusammenhanges von Fuselölbildung und Stickstoffumsatz während der Gärung.

In keinem Falle trat eine Verstärkung der Fuselölbildung gegen das Ende der Alkoholgärung hin auf, wie die Lösung auch immer zusammengesetzt war. Bei Bierwürze blieb das Verhältnis Fuselöl zu Alkohol zu verschiedenen Gärstadien ziemlich dasselbe. —

Benutzt man nun die Beobachtung, daß die Umwandlung von Leucin in Amylalkohol im ersten Gärstadium am intensivsten ist, so konnte man aus ihr den Schluß ziehen, daß außer durch reichliche Leucingabe auch durch die Anwendung geringer Zuckerkonzentration, welche die Alkoholbildung beschränken muß, auch der Amylalkoholgehalt des so gebildeten Äthylalkohols her-

---

[1]) So fand Effront (Comptes rendus **119**, 169. 1894) die Glycerin- und Bernsteinsäurebildung, ebenso wie Mach und Portele (Landwirtschaftliche Versuchsstation **16**, 470. 1892) die Glycerinbildung am Anfang der Gärung geringer als am Ende. Kayser und Dienert (Bull. de l'assoc. des Chimistes **19**, 353. 1901) dagegen die Bernsteinsäurebildung und Laborde (Comptes rendus **129**, 344. 1899) die Glycerinbildung zuerst ansteigend und dann wieder abfallend.

aufzusetzen sei. Diesem Gedankengang folgende Experimente führten zu der Erzielung eines 7 % Amylalkohol enthaltenen Äthylalkohols durch die alkoholische Gärung. —

Der bei der Selbstverdauung der Hefe gebildete Alkohol war ziemlich fuselölreich, wie das infolge der Anwesenheit von reichlich Aminosäure-Hefeeiweißabbauprodukten bei gleichzeitigem Vorhandensein von wenig vergärbaren Kohlehydraten nach dem Vorhergesagten nur natürlich war. Dagegen ließ sich durch Verwendung von Hefeeiweißverdauungsprodukten als Stickstoffquelle für Hefe keine Steigerung in der Fuselölbildung im Vergleich zu der bei gewöhnlicher Würze erreichten hervorrufen.

Durch in abgetöteter Hefe vorhandenen Hefeabbauenzyme wird Leucin nicht in Amylalkohol übergeführt. Ebensowenig fand diese Umwandlung durch in Abwesenheit von Zucker auf einer andern Kohlenstoffquelle wachsende Hefe statt, so daß der Vorgang nicht an den Aufbau des Hefeeiweiß allein, sondern auch an die Zuckergärung gebunden zu sein scheint. Aber auch die Zuckervergärung durch abgetötete Acetondauerhefe vermag während der Gärung die Bildung von Amylalkohol aus Leucin nicht zu besorgen.

Betrachten wir nun noch den Einfluß einiger anderer äußerer Verhältnisse auf die Fuselölbildung. Ein geringer Säuregehalt der Nährlösung hemmt die Fuselölbildung, die durch dauernde Säureabstumpfung kräftig gesteigert wird. Hohe Temperatur während der Gärung vermehrt, niedere vermindert die Bildung von Fuselöl. Der Einfluß der Zuckerkonzentration war in meinen Versuchen auf sie kein ausgeprägter.

Auch bei der Zuckervergärung durch Mucor racemosus bildete sich Fuselöl auf Würze und zwar mehr als bei der Hefegärung.

Vergleich verschiedener Einflüsse auf die Bildung von Nebenprodukten (Fuselöl, Glyzerin, Bernsteinsäure) bei der alkoholischen Gärung.

Meine Erörterungen werden ergeben, daß man von jetzt an gut daran tun wird von den früher Nebenprodukte der alkoholischen Gärung genannten Substanzen, Fuselöl, Glyzerin und Bernsteinsäure, als Stoffwechselprodukte der Hefe zu sprechen.

Nebenprodukte der alkoholischen Gärung dürften nur Körper genannt werden, die bei der Zuckerspaltung mit entstehen würden.

Wie ich in folgendem zeigen werde, herrscht eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Einflüssen, welche verschiedene Faktoren auf die Bildung der drei Stoffwechselprodukte der alkoholischen Gärung hervorrufen. Diese Übereinstimmung ist für Fuselöl und Glyzerin eine auf alle erforschten Faktoren ausdehnbare, während sie zwischen Fuselöl- und Bernsteinsäurebildung nicht so ausgeprägt ist.

Zuerst diskutiere ich deshalb den Vergleich zwischen der Bildung von Fuselöl und Glyzerin. Die für Fuselöl angegebenen Resultate entstammen vorstehender Arbeit, die für Glyzerin meist der Zusammenstellung in Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie IV.

„Alte Hefe“ bildet mehr Fuselöl sowie nach Pasteur[1]) und Mach und Portele[2]) mehr Glyzerin als frische, auch die Angaben Effronts[3]) lauten für das Glyzerin ähnlich.

Die Bildung von Fuselöl wie die von Glyzerin, nach Müller-Thurgau[4]), hängt von der größeren oder geringeren Lebensenergie der Hefe ab. Beide Produkte sind Stoffwechselerzeugnisse der Hefe (für Glyzerin nach Müller-Thurgau). Die Fuselölbildung steigert sich mit wachsender Stickstoffkonzentration der Nährlösung. Ebenso erfährt die Glyzerinbildung durch reichliche Ernährung der Hefe, besonders durch solche mit stickstoffhaltigen Substanzen eine Vermehrung (Thylmann und Hilger[5]), Kulisch[6])). — Bei hoher Temperatur bildet sich mehr Fuselöl als bei niedriger. Dasselbe wurde von Thylmann und Hilger[5]) und Laborde[3]) für das Glyzerin beobachtet. — Hohe Zuckerkonzentration hat einen gewissen Einfluß auf die Fuselölbildung; durch sie steigert sich auch die Glyzerinbildung (Laborde[3])). — Ein geringer Säuregehalt der Gärflüssigkeit unterdrückt teilweise die Fuselölbildung. Nach Barth[7]) wird durch einen bestimmten

---

1) Nach Czapek, Biochemie der Pflanzen **1**, 253.
2) Versuchsstat. **41**, 233, zitiert nach Czapek.
3) Comptes rendus **119**, 92. 1894.
4) Nach Angabe von Moritz Chem.-Ztg. **10**, 322. 1886.
5) Arch. f. Hyg. **8**, 451. 1888.
6) Ztschr. f. angew. Chem. **1896**, 418.
7) Weinlaube **17**, 97. 1885.

Gehalt an Essigsäure und nach Weigert[1]) durch Salicylsäure auch die Glyzerinbildung vermindert. Bei der Vergärung durch Reinkultur tritt infolge günstigerer Lebenstätigkeit der Hefe weniger Fuselöl auf. Wortmann[2]) macht ebensolche Angaben für Glyzerin bei Weinhefen und Borgmann[3]) wie Amthor[4]) bei Bierhefen. — Bei der Selbstvergärung der Hefe bildet sich Fuselöl und Glyzerin (Boussingault[5])). Die Nebenprodukte Fuselöl (Buchner und Meisenheimer[6])) wie Glyzerin und Bernsteinsäure (Buchner und Rapp)[7]) treten bei zellfreier Gärung in minderem Maße auf als bei der Gärung mittels Hefe.

Die Bernsteinsäurebildung wird weniger durch die Umstände der Gärung als die von Fuselöl und Glyzerin beeinflußt. Alte Hefe gibt auch mehr Bernsteinsäure als frische (Pasteur, Mach und Portelle a. a. O.). Hohe Temperatur vermehrt die Bernsteinsäurebildung nach Rau[8]). Dagegen vermindert sie sich bei niederer Temperatur, d. h. niederer als normal nicht. Auch hat nach ihm die Hefeernährung keinen Einfluß auf die Menge der gebildeten Bernsteinsäure.

Durch die große Übereinstimmung im Einfluß verschiedener Faktoren auf die Bildung von Fuselöl und Glyzerin wird man verlockt, den Körper, aus dem sich das Glyzerin während der Gärung bildet, ebenso wie die Fuselöl gebenden Aminosäuren unter den Produkten zu suchen, die die Hefe während der Gärung in die Nährlösung entläßt. Folgt man diesem Fingerzeig, so wird man am ehesten zum Ziele kommen und imstande sein, diese Annahme auf experimentelle Grundlage zu stellen. Bis jetzt sind alle Theorien über die Quelle des Glycerins bei der Gärung[9]) noch ebenso unbefriedigend wie es die über die Fuselölbildung vor der Ehrlichschen Beobachtung waren. In bezug auf die Bernsteinsäure-

---

[1]) Mitteilungen der chemisch-physiologischen Versuchsstation in Klosterneuburg **1888**, Heft 5, S. 58.

[2]) Landw. Jahrbücher **23**, 552. 1894.

[3]) Ztschr. f. analytische Chem. **25**, 532. 1886.

[4]) Ztschr. f. physiol. Chem. **12**, 64. 1888.

[5]) Ann. de chim. et de phys. 5 sér. **22**, 118. 1881.

[6]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **39**, 3208. 1906.

[7]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **34**, 1527. 1901.

[8]) Archiv f. Hyg. **14**, 225. 1892.

[9]) Vergleiche Lafar. Handb. d. techn. Mykologie **4**, 380.

bildung möchte ich in meinem Urteil noch zurückhaltender sein. Doch daß auch sie ein Stoffwechselprodukt der Hefe ist und nicht aus dem Zucker gebildet wird, darüber kann kein Zweifel herrschen.

Schlußbetrachtung.

Wir haben im Verlauf der Arbeit des öfteren davon gesprochen, daß ungünstige Lebensbedingungen, welche mit gesteigertem Stickstoffumsatz und in manchen Fällen auch mit einem Absterben von verhältnismäßig viel Hefe verbunden sind, die Fuselölbildung begünstigen. Wir finden solche ungünstigen Lebensbedingungen bei gleichzeitiger Intensierung der Fuselölbildung bei höherer Gärtemperatur, Säureabstumpfung der Nährlösung, sehr hoher Zuckerkonzentration, bei geringer Stickstoffgabe und Überfütterung der Hefe mit Stickstoff. Ein schwacher Säuregehalt der Lösung dagegen, der bekanntlich auf das Leben der Hefe günstig wirkt, setzt auch die Fuselölbildung herab. Der Satz: ungünstige Lebensbedingung der Hefe befördert die Fuselölbildung, hat daher seine Berechtigung.

Stellen wir uns nun zum Schluß die wichtige Frage, welche Rolle spielt die Fuselölbildung im Haushalt der Hefe? Wir müssen gleich vorausschicken, daß sie, ebenso wie die noch wichtigere nach der Rolle der Äthylalkoholbildung, schwer zu beantworten ist. Für die Alkoholbildung ist die Meinung zwischen dem Energiegewinn, der der Zelle durch die Zuckerspaltung erwächst, und der Abwehr anderer Organismen, die das Leben der Hefe bedrohen, hohe Alkoholkonzentration aber nicht ertragen können, geteilt. Für die Fuselölbildung kommt der Energiegewinn bei der Umwandlung von Aminosäure in Alkohol nur in geringem Maße in Betracht. Noch weniger läßt sich an die Abwehr anderer Organismen durch die Giftigkeit[1]) des im Vergleich zum Äthylalkohol doch nur in minimaler Menge vorhandenen Fuselöls denken. —

Wir haben aber im Verlauf der Arbeit gesehen, daß sich in allen untersuchten Gärungsalkoholen Fuselöl vorfand. Wir wissen weiter, daß die Hefe Aminosäuren, die sich in ihrer Nährlösung

---

[1]) Fuselöl wirkt bekanntlich auf den menschlichen Organismus äußerst giftig.

vorfindet, ausnutzt und zur Beschaffung der verschiedenartigen Atomkomplexe ihres Eiweis spaltet, wobei sich Fuselöl bildet. Diese Aminosäuren sind nun in der Nährlösung immer vorhanden. Sie sind in ihr entweder präformiert, da ja die Hefe irgendwelcher Aminosäurerestgruppen zum Aufbau ihres kräftigen Plasmas bedarf und diese auch Fuselölgebenden Aminosäuren angehören können. Oder wenn solche Aminosäuren ursprüglich nicht vorhanden waren, so kommen sie doch immer als Hefeausscheidungsprodukte in die Gärflüssigkeit. Man kann also sagen, keine Gärung ohne Fuselölgebende Aminosäuren in der Gärflüssigkeit, folglich auch keine Gärung ohne gleichzeitige Bildung von Fuselöl. Diese Körper sind also reine Exkrete, die der Hefe in ihrem Stoffwechsel nicht mehr dienen können.

Es scheint nun, als rein zufälliges Zusammentreffen, daß der aus dem Zucker gebildete Äthylalkohol und das Eiweisstoffwechselprodukt „Fuselöl" beides Alkohole sind. Deshalb ist nicht zu verwundern, daß früher aus dieser Übereinstimmung auf die Fuselölbildung aus Zucker geschlossen wurde. So ist also ebenso wie die Glyzerinbildung die Fuselölbildung von der Zuckerzersetzung ganz unabhängig.

Die Resultate der ganzen Arbeit noch einmal zusammenzustellen, ist wegen der Länge, welche die Ausführungen benötigen würden, nicht angängig. Es muß deshalb auf die Zusammenfassung der einzelnen Teile verwiesen werden. Auch in diesen konnten nicht alle Ergebnisse angeführt werden. Denn die Kompliziertheit der zusammenwirkenden Faktoren zwingt zum Gebrauch vieler Worte, wenn man sie klar darlegen will. Es muß daher nicht nur für die Einzelheiten sondern auch für die scharfe Fassung der sich wechselseitig beeinflussenden Faktoren auf die Spezialteile verwiesen werden.

Eins soll noch zum Schluß hervorgehoben werden, daß sich nämlich beim tieferen Eindringen in die Kenntnis des Hefelebens die Beeinflussung einer Lebensäußerung der Hefe durch eine andere, die Abhängigkeit der Produkte der Hefetätigkeit zu

gleicher Zeit von mehr als einer Lebensbedingung, immer klarer herausstellte.

Der Fortschritt, den diese Arbeit auf dem Gebiete der Physiologie der Hefe bedeuten soll, dürfte daher nach der Meinung des Verfassers nicht in der Beschaffung neuer Kenntnisse allein sondern in dem Versuch bestehen, das gleichzeitige Zusammenwirken verschiedener Einflüsse auf die Lebensäußerungen der Hefe mehr zu berücksichtigen, als das durch die meisten Arbeiten in der Vergangenheit geschehen ist. Daß darüber noch weit hinausgegangen werden kann, wird gewiß neuer Fortschritt in der Zukunft zeigen.

Studien über natürliche Farbstoffe.

Von

L. Marchlewski.

(Aus dem chemisch-medizinischen Institut der Universität Krakau.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1906.)

Hierzu Tafel III.

Im nachfolgenden teile ich ausführlich einige Resultate meiner Untersuchungen über natürliche Farbstoffe mit, die bereits z. T. in Kürze der Akademie der Wissenschaften in Krakau vorgelegt wurden. Dieselben beziehen sich sowohl auf tierische wie auf pflanzliche Farbstoffe; in dieser Mitteilung soll jedoch vorläufig nur der letzteren gedacht werden.

1. Studien über Lipochrome.

a. Über den Farbstoff der Bixa Orleana.

Mitbearbeitet von Ladislaus Matejko.

Bixin war bereits häufig Gegenstand mehr oder weniger ausführlicher Untersuchungen. Die greifbarsten Resultate wurden von Etti[1]) und von Zwick[2]) erhalten, aber trotz der großen Mühe, die aufgewandt wurde, wissen wir bis heute sehr wenig über den inneren Bau dieses interessanten Körpers.

Meine Aufmerksamkeit wurde auf das Bixin aus folgenden Gründen gelenkt: es besitzt ein Absorptionsspektrum, welches demjenigen der Lipochrome, zu welchen wir auch die gelben Begleiter des Chlorophylls rechnen, sehr ähnlich ist, und da wir jetzt gestützt auf die Geschichte der Entdeckung der chemischen Ver-

---

[1]) Berl. Ber. **11**, 864.

[2]) Über den Farbstoff des Orleans. Würzburg **1899**.

wandtschaft des Blutfarbstoffs und des Blattfarbstoffs der Verwandtschaft von Absorptionsspektren eine gewisse Bedeutung für die Beurteilung der Frage nach der Zugehörigkeit anscheinend sehr verschiedener Körper zu derselben Gruppe zuschreiben dürfen, so erschien es mir wahrscheinlich, daß Bixin ebenfalls zu den Lipochromen zu rechnen wäre. Aus einer solchen Verwandtschaft des Bixin mit den Lipochromen erwächst für die Untersuchung dieser Körperklasse vorderhand nur ein rein technischer Nutzen, denn während die Lipochrome im engeren Sinne nur sehr schwer zu beschaffende Körper sind, ist Bixin verhältnismäßig leicht auch in größeren Mengen zu haben und ist daher das Studium desselben wesentlich erleichtert. Trotzdem mag schon hier betont werden, daß das Studium des Bixins ein durchaus nicht leichtes zu sein verspricht.

Methode der Reindarstellung.

Die älteste bekannte Methode, welche von Etti angegeben wurde und welche angeblich zu kristallisiertem Bixin führen soll, führte in unseren Händen nicht zum Ziel. Hingegen fanden wir Zwicks Methode durchaus zuverlässig, obwohl ziemlich umständlich. Dieselbe besteht in folgendem: Handelsorlean wird zunächst getrocknet und sodann, nach dem Pulvern, mit siedendem Chloroform ausgezogen. Das Extrakt wird eingedampft und in einem Soxhletschen Apparat zunächst mit Ligroin, dann mit Chloroform extrahiert. Bereits während des Extrahierens können bei entsprechenden Konzentrationen des Auszuges Kristalle bemerkt werden; dieselben werden behufs vollständiger Reinigung noch zwei- oder dreimal aus Chloroform kristallisiert. Zwick gibt für seine reinsten Präparate den Schmelzpunkt 188^{0} C. an. Wir haben die Zwicksche Methode etwas modifiziert und zwar die Behandlung der Rohprodukte mit Ligroin umgangen und dabei ein wie wir glauben absolut reines Bixin erhalten. Als Ausgangsprodukt diente uns ein von der Firma Alder & Co. in Wien bezogener Orleanfarbstoff. Derselbe stellte eine ziegelrote Paste dar, die leicht auf dem Wasserbade getrocknet werden konnte. Das trockne Extrakt wird nicht zu fein pulverisiert und mit kaltem Chloroform während zweier Tagen mazeriert, wobei die Menge des Chloroforms gerade genügte, um die grobkörnige Masse zu bedecken. Dieses erste Extrakt wurde abgelassen, das Lösungsmittel abdestilliert und zur

weiteren Extraktion benutzt. Der Rückstand dieser ersten Extraktion stellt eine halbfeste, mitunter ölige Masse dar, und wird, obwohl er ziemlich viel Farbstoff enthält, nicht weiter in Betracht gezogen, da reines Bixin aus demselben nach unseren Erfahrungen überhaupt nicht zu erhalten ist. Der zweite Chloroformextrakt, ob in der Kälte oder in der Wärme dargestellt, gibt nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels eine spröde, rotbraune Masse, welche sehr leicht auf folgende Art umkristallisiert werden konnte. Man löste dieselbe in warmem Chloroform, setzte Alkohol hinzu und unterwarf das Gemisch der Destillation. Sobald das entsprechende Mischungsverhältnis von Alkohol und Chloroform zustande kam, begannen sich glitzernde Kristalle auszuscheiden; in diesem Momente wurde die Destillation unterbrochen. Bei der nun folgenden Abkühlung nahm die Abscheidung des kristallisierten Bixins rasch zu. Unter dem Mikroskop betrachtet, erwiesen sich die so erhaltenen Präparate als nicht absolut rein; zwischen dem kristallisierten Bixin wurden amorphe braune Massen beobachtet, was eine Reihe von Kristallisationen aus Chloroform-Alkoholgemischen notwendig machte. In der Regel genügen vier bis fünf Kristallisationen. Übrigens kann das erste kristallinische Produkt mit gleich gutem Resultate aus Eisessig kristallisiert werden.

Kristallisiertes Bixin stellt eine hellrote Masse dar, falls die Kristalle klein sind, oder eine rotbraune, an den roten Phosphor erinnernde, falls die Kristalle größer sind. Sein Schmelzpunkt liegt, falls schnell erhitzt wird, bei 198°; bei langsamem Erhitzen schmilzt es schon bei 191,5°. Unter dem Mikroskop betrachtet, stellt das Bixin Rhombe und Rhomboide vor.

In reinem Zustande ist es nur spärlich in Chloroform löslich. 100 g des letzteren lösen bei 25° nur 0,34 g Bixin. In Alkohol, Äther oder Eisessig löst es sich in der Kälte noch schwieriger, während siedender Eisessig es mit Leichtigkeit aufnimmt. Sehr leicht auch schon in der Kälte löst es sich in Pyridin und Chinolin. Nitrobenzol löst es beim Siedepunkte sehr leicht. Ob die leichte Löslichkeit in den genannten Basen durch den sauren Charakter des Bixins zu erklären ist, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Dem Lichte ausgesetzt, erleidet Bixin eine Zerstörung, die bereits nach kurzem Belichten mit direktem Sonnenlicht zu konstatieren ist.

Konzentrierte Schwefelsäure löst es bekanntlich mit kornblumenblauer Farbe auf, und erinnert Bixin auch diesbezüglich an Lipochrome.

Wir haben eine größere Anzahl von Analysen ausgeführt, von welchen einige hier mitgeteilt werden mögen:

1.	0,1195 g	Subst.	gaben	0,3269 CO_2	und	0,0839	H_2O
2.	0,1175 „	„	„	0,3211 „	„	0,0812	„
3.	0,1200 „	„	„	0,3278 „	„	0,0845	„
4.	0,1637 „	„	„	0,4491 „	„	0,1078	„
5.	0,1603 „	„	„	0,4404 „	„	0,1064	„
6.	0,1875 „	„	„	0,5149 „	„	0,1258	„

Diese Werte entsprechen:

1.	74,60 % C	7,77 % H
2.	74,32 „ „	7,65 „ „
3.	74,47 „ „	7,74 „ „
4.	74,82 „ „	7,31 „ „
5.	74,92 „ „	7,37 „ „
6.	74,89 „ „	7,45 „ „
im Mittel	74,70 % C	7,55 % H.

Die erhaltenen Werte stimmen sehr gut mit denjenigen früherer Beobachter überein. Etti fand 74,64 % C und 7,66 % H, Zwick 74,715 % C und 7,81 % H. Die Formel $C_{28}H_{34}O_5$, zum ersten Mal von Etti vorgeschlagen, verlangt 74,66 % C und 7,55 % H, wird also auch durch unsere Resultate gestützt.

Sehr interessant ist das Spektrum des Bixins. Ein Vergleich der Reproduktionen unserer Photographien, die mit Hilfe eines Hilgerschen Quarzspektrographen erhalten wurden, mit denjenigen, die C. A. Schunck[1]) für die Lipochrome gegeben hat, wird sofort zeigen, daß die Absorptionsspektra demselben Typus zugehören. Ein Unterschied ist jedoch vorhanden, auf den hier besonders hingewiesen sein mag; während nämlich die eigentlichen sogenannten Lipochrome das äußerste Ultraviolett durchlassen, verursacht Bixin zwei, allerdings in den Reproduktionen nicht besonders deutlich erscheinende Bänder in der Region der Sonnenlinien N und O.[2])

---

[1]) Proc. Roy. Soc. **63**, 389 (1898), **65** (1899).

[2]) Anmerkung während der Korrektur. Mein Freund, Herr C. A. Schunck, macht mich auf den Umstand aufmerksam, daß der Farbstoff

Die außerordentliche Färbekraft des Bixins wird besonders durch die sechs ersten Streifen der beigefügten Platte demonstriert. Die Aufnahmen wurden mit einer Lösung von Bixin in Chloroform begonnen, welche in 1 ccm 0,0001 g enthielt; die Dicke der durchlichteten Schicht hetrug 19 mm. Die Lösung ließ überhaupt kein Licht durch, ebenso die nächste, halb so starke Lösung. Die dritte untersuchte Lösung mit der Konzentration von 0,000025 g pro 1 ccm zeigt bereits ein breites, dunkles Band auf der Linie F und zwei, bereits erwähnte äußerst schwache Bänder im äußersten Ultraviolett. Diese Bänder wurden von früheren Forschern nicht beobachtet. Die vierte Lösung, welche in 1 ccm 0,000012 g enthielt, zeigt bereits nicht mehr diese zwei Bänder, sondern nur das erwähnte breite dunkle Band, welches bei noch weiterer Verdünnug sich in drei Bänder auflöst, von denen das stärkste vor der F-Linie, das zweite schwächere hinter derselben und das dritte schwächste in der Nachbarschaft der k_β-Linie zu liegen kommt.

Die Salze des Bixins.

Die Alkalisalze des Bixins waren bereits zweimal Gegenstand von Untersuchungen. Etti fand, daß Bixin zwei Reihen von Salzen liefert, solche mit einem Atom eines einwertigen Metalls und solche mit zwei Atomen. Er erhielt dieselben durch das Zusammenwirken von Kalium- oder Natriumkarbonat und alkoholischen Bixinlösungen. Zwick, der Ettis Versuche wiederholte, konnte auf diese Art keine kristallinischen Produkte erhalten, erhielt erst solche, als er auf in 12%igem Alkohol gelöstes (?) Bixin Kaliumhydroxyd einwirken ließ. Die Zusammensetzung der von Zwick erhaltenen Produkte entsprach der Formel $C_{30}H_{32}K_2O_5 + 2H_2O$. Übrigens bemerkt Zwick, daß diese Methode nicht immer zu kristallisierten Produkten führt. Nach unseren Erfahrungen macht es keine Schwierigkeiten einatomige Salze des Bixins zu erhalten, wenn man mit den Alkalialkoholaten arbeitet. Das Natriumsalz erhielten wir nämlich wie folgt: 0,23 g metallisches Natrium löst man in 75 ccm 70%igen Alkohol und gießt die Lösung in eine feine Suspension von 4,5 g Bixin in 75 ccm Alkohol von derselben

der Pomidoren, das sog. Lycopin, ebenfalls ein Band in dieser Region zeigt. Andererseits soll das Lycopin, neueren Untersuchungen nach, ein Dikaroten sein. Daraus ergibt sich die Richtigkeit der Annahme, daß das Bixin zu den Lipochromen gehört.

Konzentration. Die Mischung wird nun auf dem Wasserbad erwärmt, bis Lösung erfolgt und dann rasch filtriert. Im Filtrat bemerkt man sehr bald die Bildung von glitzernden Kristallen des Natriumsalzes. Man filtriert dieselben rasch ab, wäscht mit etwa 70%igen Alkohol, kristallisiert nochmals aus 70%igen Alkohol und trocknet bei 30°. Höheres Erhitzen ist zu vermeiden, da die Substanz dabei Sauerstoff absorbiert und die ursprüngliche kupferrote Farbe einer mehr gelbstichigen Platz macht.

Analyse: 0,3040 g Subst. gaben 0,0481 g Na_2SO_4

gefunden	berechnet $C_{28}H_{33}O_5Na$
Na: 5,12%	4,87%

Das Kaliumsalz kann in ganz ähnlicher Art wie das Natriumsalz erhalten werden. Wir benutzten 4,5 g Bixin, 0,39 g Kalium und 150 ccm Alkohol von 70%. Das Kaliumsalz kristallisiert in sehr dünnen Naden, die eine dunkel kupferote Farbe besitzen.

0,2463 g Subst. gaben 0,0433 g K_2SO_4

gefunden	berechnet für: $C_{28}H_{33}O_5K$
K: 7,88%	7,99%

Bixin enthält eine Methoxylgruppe.

Diese Tatsache wurde von Zwick entdeckt. Wir wiederholten diese Bestimmung und können die Angabe von Zwick durchaus bestätigen:

0,3750 g Bixin gaben 0,2000 g AgJ

gefunden	berechnet $C_{27}H_{31}O_4(OCH_3)$
OCH_3 7,01%	6,90%

Alkylierung des Bixins.

Angesichts des erwiesenen sauren, bezw. phenolartigen Charakters des Bixins versuchten wir dasselbe zu alkylieren, fanden dabei aber, daß, obwohl alkylierende Agentien Bixin nicht unverändert lassen, die dabei entstehenden Körper in kristallisiertem Zustande nicht zu erhalten sind.

Wir erhitzten beispielsweise 4 g des Natriumsalzes mit 40 g frisch destilliertem Dimethylsulfat auf dem Wasserbade. Die ursprüngliche violett-grüne Farbe der Lösung machte nach halbstündigem Erwärmen einer grünen Platz, später wurde die Lösung olivebraun. Nach zweistündigem Erwärmen wurde die Lösung in 50 ccm Wasser gegossen, wobei eine harzige Masse abgeschieden

wurde, die nach 24 stündigem Stehen in der Kälte erhärtete. Nach dem Trocknen löste sich dieselbe leicht in Chloroform mit olivebrauner Farbe, schwer in Alkohol, sehr wenig in Benzol und Äther. Konz. Schwefelsäure löst sie mit dunkelvioletter Farbe, welche nach einiger Zeit violettbraun wird. Da alle Versuche, diesen Körper zu kristallisieren, fehlschlugen, wurde er in Chloroform gelöst, filtriert und vorsichtig eingedampft. Erhalten wurde eine glänzende spröde olivebraune Masse, die bei der Analyse folgende Werte ergab.

1. 0,2346 g gaben 0,2315 g AgJ
2. 0,2140 „ „ 0,2112 „ „

berechnet für $C_{27}H_{30}O_3(OCH_3)_2$	gefunden
13,36 % OCH_3	1. 13,01 % OCH_3
	2. 13,02 % „

Diese Zahlen beweisen zwar, daß Alkylierung stattgefunden hat, es ist jedoch fraglich, ob die erhaltene Substanz einheitlich war und ob bei ihrer Bildung nicht eine tiefergehende Umwandlung des Bixins eintrat.

Reduktion des Bixins.

Über die Reduktion des Bixins haben bereits Etti und Zwick gearbeitet, aber die erhaltenen Resultate waren wenig versprechend. Glücklicher waren wir insofern, als es uns gelang, ein Reduktionsprodukt im kristallinischen Zustande zu erhalten. Die Darstellung desselben ist jedoch schwierig und mit großen Substanzverlusten verbunden. Verfahren wurde wie folgt: 5 g Bixin wurden in 100 ccm Eisessig gelöst und zu der Lösung in kleinen Portionen 10 g Zinkstaub hinzugesetzt. Nach kurzer Zeit schlägt die ursprüngliche rotbraune Farbe in eine feurigorange Farbe um. Jetzt wurde das Gefäß mit einem Bunsenventil versehen und die Lösung nach weiteren drei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dieser Zeit wurde filtriert. Im Filtrat schieden sich sehr bald glitzernde orange gefärbte Kristalle ab. Dieselben wurden im Vakuum neben Kalihydrat getrocknet. Sodann erfolgte ein Waschen mit Wasser behufs Entfernung von Zinkacetat und schließlich Trocknen über Schwefelsäure in einem Kohlensäurestrom. Zur weiteren Reinigung wurden die Kristalle noch dreimal aus siedendem Eisessig umkristallisiert und bei 90° in einer Kohlensäureatmosphäre getrocknet.

Das Reduktionsprodukt des Bixins stellt eine in Rhomben kristallisierende Substanz dar, von schöner Orangen-Farbe. Es löst sich am besten in Eisessig; Chloroform löst es nur spärlich, noch weniger Alkohol und Äther. In wässerigen Alkalien ist es unlöslich, hingegen alkoholisches Kali nimmt es mit Leichtigkeit auf. Bei schnellem Erhitzen schmilzt es bei 208—210°, bei langsamem bei 200,5°.

Nachfolgend geben wir Analysen dieses Produktes wieder; betont muß jedoch werden, daß wir dieselben vorderhand nicht als absolut sicher betrachten, da, wie unten gezeigt wird, das Reduktionsprodukt sich äußerst leicht durch den Sauerstoff der Luft oxydiert:

1. 0,1242 g Subst. gaben 0,0854 H_2O und 0,3435 CO_2
2. 0,1222 „ „ „ 0,0851 „ „ 0,3374 „
3. 0,1430 „ „ „ 0,0986 „ „ 0,3949 „

entsprechend:

1. 7,64 % H und 75,42 % C
2. 7,73 „ „ „ 75,30 „ „
3. 7,66 „ „ „ 75,31 „ „

Es wäre vorläufig zwecklos, eine Formel aufzusuchen, die den obigen Werten entsprechen würde, aus dem oben angeführten Grunde. Die leichte Oxydierbarkeit des Reduktionsproduktes des Bixins dokumentierte sich bereits an Präparaten, die längere Zeit bei Anwesenheit von Luft im Exsikkator aufbewahrt waren. Die ursprüngliche Farbe verblaßt und nach einigen Tagen erhält man ein fast farbloses Produkt. Diese Umänderung findet besonders schnell bei etwas höheren Temperaturen statt, z. B. bei 100°. Das Verblassen der Farbe wird von einer bedeutenden Schmelzpunkterniedrigung begleitet. Die unten angeführten Analysen von Präparaten, die bis zur Gewichtskonstanz der Wirkung der Luft ausgesetzt waren, demonstrieren die tiefgehende Veränderung, welche bei der besprochenen Oxydation stattfindet:

0,1611 g Subst. gaben 0,0861 g H_2O und 0,3438 CO_2
0,1088 „ „ „ 0,0570 „ „ „ 0,2347 „
0,1165 „ „ „ 0,0618 „ „ „ 0,2507 „

entsprechend:

1. 5,93 % H und 58,20 % C
2. 5,82 „ „ „ 58,83 „ „
3. 5,88 „ „ „ 58,68 „ „

Die Eigenschaft des Reduktionsprodukts des Bixins, sich sehr schnell an der Luft zu oxydieren, teilt es mit den Lipchromen. Karoten beispielsweise kann nicht längere Zeit bei Anwesenheit von Luft aufbewahrt werden. Diese Verhältnisse machen die angenommene Verwandtschaft des Bixins zu den Lipchromen noch wahrscheinlicher[1]). Eine ausführlichere Untersuchung der optischen Eigenschaften des Reduktionsprodukts des Bixins haben wir auf die Zeit verschoben, wenn uns eine besseres Spektograph, als das bis jetzt in unserem Besitze befindliche, zur Verfügung stehen wird.

Die Reduktion des Bixins führt zu nicht kristallisierenden Produkten, wenn die oben angegebenen Bedingungen nicht eingehalten werden.

Das Studium des Bixins und besonders seines Reduktionsprodukts wird fortgeseszt.

2. Studien über die Bestandteile der Wurzeln der Datisca Cannabina.

Mitbearbeitet von A. Korczyński.

Vor einiger Zeit beschrieb der eine von uns mit E. Schunck Resultate, die beim Studium der Bestandteile der Wurzeln von Datisca Cannabina erhalten wurden. Das damals benutzte Rohmaterial erhielt Dr. Schunck von Herrn Dyer, Direktor der botanischen Gärten in Kew. Wir isolierten eine Substanz, deren Zusammensetzung die Formel $C_{21} H_{24} O_{11} + H_2O$[2]), welche bei der hydrolytischen Spaltung Rhamnose und einen Körper $C_{15} H_{12} O_6$ lieferte. Letzterer schmolz bei 239°. Außer diesem Hauptmaterial besaßen wir noch kleinere Proben unbekannter Herkunft, deren eingehende Untersuchung jedoch ausgeschlossen war; soviel konnte damals nur konstatiert werden, daß eine der Proben ein Glukosid enthielt, welches bei der Spaltung einen fermentierenden Zucker gab, der also mit Rhamnosa nicht identisch sein konnte. Lange schon hatte ich den Wunsch, der Sache auf den Grund zu gehen und dank der Liebenswürdigkeit des Herrn J. H. Burkhill, Vorsteher des Indian Museums in Kalkutta, war ich in der Lage,

---

[1]) Es verdient noch hervorgehoben zu werden, daß unter gewissen Bedingungen Bixin bei der Reduktion einen nach Veilchen riechenden Körper liefert. Nach Arnaud und einigen anderen Autoren entwickelt Karoten bei Erhitzen nach Veilchen riechende Dämpfe.

[2]) Liebigs Annalen 277, 261.

größere Proben der Wurzeln zu untersuchen, die in der Provinz Punjab gesammelt waren.

Die Wurzeln wurden wie folgt verarbeitet: Zunächst wurden dieselben mit starkem Alkohol extrahiert und das Extrakt eingedampft. Hierbei wurde ein harziger Rückstand erhalten, der mit siedendem Wasser behandelt wurde; ein harziger Körper blieb hierbei ungelöst. Der wässerige Auszug gab nach einiger Zeit eine voluminöse hellgelbe Ausscheidung eines halbkristallinischen Körpers, der nach dem Abfiltrieren und Waschen mit Wasser nochmals aus siedendem Wasser umkristallisiert wurde. Die zweite Kristallisation wurde nach dem Trocknen über konz. Schwefelsäure im Vakuum in absolutem Alkohol gelöst und die Lösung mit einer großen Menge trockenen Äthers versetzt. Nach 24-stündigen Stehen schieden sich hellgelb gefärbte Kristalle ab, die nochmals aus siedendem Wasser umkristallisiert wurden. Schmelzpunkt 190°.

Der zweiten wässerigen Mutterlauge konnte noch eine ziemlich große Menge der Substanz durch Zusatz von Äther entzogen werden. Letzterer verursacht nämlich eine nahezu weiße Fällung, welche nach dem Reinigen aus Alkohol und Äther, wie oben beschrieben, und Krystallisieren aus siedendem Wasser ebenfalls einen Körper vom Schmelzpunkt 190° liefert.

Die in dieser Weise isolierte Substanz ist ein glukosidartiger Körper. Durch siedende verdünnte Schwefelsäure wird sie gespalten unter Bildung eines Zuckers und eines in siedendem Wasser schwer löslichen Körpers. Letzterer wurde auf einem Filter gesammelt, gut gewaschen und nach dem Trocknen aus siedendem Eisessig umkristallisiert. Das Kristallisieren aus diesem Medium wurde so oft wiederholt, bis in dem erhaltenen Produkte keine Methoxylgruppen mit Hilfe der Zeiselschen Methode nachgewiesen werden konnten. Das in dieser Weise gereinigte Produkt wurde schließlich noch aus verdünntem Alkohol zweimal umkristallisiert. Man erhält so hellgelbe Nadeln eines Körpers, der weit höher schmilzt, als das von Schunck und dem einen von uns studierte Produkt, nämlich bei 268—269°. In anderen Beziehungen verhalten sich beide Körper analog. Die Lösungsverhältnisse stimmen ziemlich überein, obwohl wir einen direkten Vergleich nicht ausführen konnten. In konz. Schwefelsäure löst sich das jetzt untersuchte Produkt mit gelblicher Farbe; die

Lösung fluoresziert grünlich. Fehlings Lösung wird nicht reduziert, wird aber grün, hingegen Silbernitrat wird bei Anwesenheit von Ammoniak in der Siedehitze reduziert.

Die Zusammensetzung des gegenwärtig isolierten Körpers entspricht der Formel $C_{15}H_{10}O_6$ und nicht $C_{15}H_{12}O_6$ und ist er daher höchst wahrscheinlich identisch mit der von Stenhouse[1]) untersuchten Substanz, die er Datiscetin nannte. Ganz reine Präparate enthalten keine Alkyloxygruppen, während weniger sorgfältig gereinigte stets solche enthalten. Im Maximum fanden wir jedoch nur 0,8 %. Die von E. Schunck und dem einen von uns untersuchte Substanz enthielt viel mehr Alkyloxygruppen und diese Tatsache unter anderen führte zu der Annahme, daß der Farbstoff der Datisca Cannabina-Wurzeln ein Methoxyxanthonderivat ist. Auf Grund unserer vorliegenden Untersuchungen muß man zum Schluß gelangen daß diese Wurzeln zwei verschiedene Farbstoffe enthalten, deren relative Mengen in verschiedenen Proben wechseln; der eine derselben schmilzt bei 237°, der andere bei 268—269° und nur dieser letztere sollte den Namen „Datiscetin", welcher von Stenhouse für die Substanz $C_{15}H_{10}O_6$ vorgeschlagen wurde, führen. In den von uns jetzt untersuchten Wurzeln ist das alkylierte Produkt ebenfalls vorhanden, seine Menge tritt aber im Verhältnis zu dem alkylfreien Körper sehr zurück.

Analysen des Datiscetins:

1. 0,2000 g geben 0,4604 g CO_2 und 0,0662 g H_2O
2. 0,2028 „ „ 0,4670 „ „ „ 0,0644 „ „
3. 0,2048 „ „ 0,4709 „ „ „ 0.0644 „ „
4. 0,2030 „ „ 0,4678 „ „ „ 0,0648 „ „
5. 0,2038 „ „ 0,4694 „ „ „ 0,0674 „ „

entsprechend:

		C		H
	1.	62,78 % C	und	3,62 % H.
	2.	62,80 „ „	„	3,52 „ „
	3.	62,71 „ „	„	3,49 „ „
	4.	62,84 „ „	„	3,53 „ „
	5.	62,82 „ „	„	3,67 „ „
im Mittel		62,79 % C		3,57 % H.

[1]) Liebigs Annalen **98**, 174.

Die Formel $C_{15}C_{10}O_6$ verlangt 62,93 % C und 3,49 %. Nach dem Fettstellen der Formel des Datiscetin versuchten wir Auskunft über die Funktionen der sechs Sauerstoffatome seines Moleküls zu erhalten. Während der Körper $C_{15}H_{12}O_6$ beim Acetylieren nur unerquickliche Körper lieferte, die nicht rein zu gewinnen waren, lieferte Datiscetin leicht ein Acetylierungsprodukt, das höchstwahrscheinlich vier Acetylgruppen enthält.

Tetraacetyldatiscetin.

Die Acetylierung des Datiscetin gelingt leicht nach der Methode von Liebermann. Das Acetylierungsgemisch wurde zuerst mit Alkohol behandelt, um das überschüssige Essigsäureanhydrid zu zerlegen und dann in viel Wasser gegossen. Dabei wurde eine harzige Masse erhalten, die nach einigen Tagen in Berührung mit Wasser erstarrte. Die Reinigung des Acetylproduktes wurde durch mehrmaliges Kristallisieren aus Äther erzielt. Es stellt eine rein weiße in Nadeln kristallisierende Substanz dar, die bei 138° schmilzt.

Analysen:

1. 0,1830 Subst. gaben 0,4088 g CO_2 und 0,0660 g H_2O
2. 0,1812 „ „ 0,4050 „ „ „ 0,0676 „ „

entsprechend:

		C		H
	1.	60,92 % C	und	4,03 % H
	2.	60,96 „ „	„	4,17 „ „
Mittel		60,94 „ „	„	4,10 „ „

die Formel $C_{15}H_6O_6(COCH_3)_4$ verlangt:

C : 60,79 %
H: 3,96 „

Die Bestimmung der Acetylgruppen durch Verseifung mit Alkalien führte zu keinen scharfen Resultaten, da Datiscetin selbst durch längeres Kochen mit auch verdünnten Alkalien zersetzt wird. Es war daher wünschenswert die Annahme von dem Vorhandensein von 4 Hydroxylgruppen im Datiscetin noch durch das Studium anderer Derivate zu bestätigen.

Tetrabenzoyldatiscetin.

Baumanns Methode der Benzoylierung gab auf das Datiscetin angewandt keine guten Resultate. Hingegen verläuft die Benzoylierung glatt bei Anwendung von Benzoylchlorid und Pyridin.

6 g Datiscetin wurden in 50 g Pyridin gelöst und unter Kühlung mit 12·3 frisch destilliertem Benzoylchlorid, welches in kleinen Portionen zugesetzt wurde, geschüttelt. Die ursprüngliche braune Farbe der Lösung machte allmählich einer rotbraunen Platz und Pyridinchlorhydrat wurde in großer Menge abgeschieden. Nach 24stündigem Stehen wurde die Mischung in verdünnte Schwefelsäure gegossen und der abgeschiedene Niederschlag nach zwei Tagen filtriert, tüchtig gewaschen und im Exsikator getrocknet. Das Produkt wurde schließlich aus siedendem verdünnten Aceton einigemal kristallisiert. Es bildet weiße Nadeln, die bei 190—191° schmelzen, sich nur schwer in Eisessig, Alkohol und Äther lösen. Die Analysen beweisen, daß ein Tetrabenzoyldatiscetin vorliegt:

1. 0,1886 g Subst. gaben 0,5078 g CO_2 und 0,0665 g H_2O
2. 0,1799 „ „ „ 0,4831 „ „ „ 0,0630 „ „
3. 0,1880 „ „ „ 0,5055 „ „ „ 0,0647 „ „

entsprechend:

		C		H
	1.	73,43 % C	und	3,94 % H
	2.	73,24 „	„	3,91 „
	3.	73,33 „	„	3,85 „
im Mittel		73,33 % C		3,90 % H

Die Formel $C_{15}H_6O_6(COC_6H_5)_4$ verlangt:

C: 73,48 %
H: 3,73 „

Tetrabenzosulfoyldatiscetin.

Diese Verbindung bildet sich sehr leicht, wenn man Datiscetin bei Anwesenheit von Pyridin mit Benzosulfonsäurechlorid schüttelt. 5 g Datiscetin wurden in der zehnfachen Menge trocknen, reinen Pyridins gelöst und mit 13,9 g Benzolsulfonsäurechlorid geschüttelt. Der in üblicher Weise isolierte Ester fällt zunächst in Form eines gelben Öles aus, welches nur sehr langsam erstarrt. Nach zweitägigem Stehen erhält man schließlich eine harte Masse, welche aus Eisessig kristallisiert wird. Die schwache Braunfärbung der ersten Kristallisation kann durch Erhitzen der eisessigsauren Lösung mit Tierkohle entfernt werden. Das reine Produkt stellt weiße zu Sternen vereinigte Nadeln dar, die nach dem Trocknen über Kalihydrat bei 188° schmelzen. In Alkohol und Äther sind die Kristalle sehr schwer löslich.

Analysen:

1. 0,1576 g Subst, gaben 0,3207 g CO_2 und 0,0470 g H_2O und 0,1786 g $BaSO_4$ (nach Dennstedt)
2. 0,1706 g gaben 0,3448 g CO_2 u. 0,0510 g H_2O u. 0,1848 g $BaSO_4$
3. 0,1728 „ „ 0,3601 „ „ „ 0,0486 „ „
4. 0,2010 „ „ 0,2249 „ $BaSO_4$

entsprechend

	C		H	S
1.	55,47 % C	und	3,26 % H	15,54 % S
2.	55,12 „ „	„	3,34 „ „	14,86 „ „
3.	55,29 „ „	„	3,14 „ „	—
4.				15,36 „ „

Die Formel $C_{15}H_6O_6(SO_2 \cdot C_6H_5)_4$ verlangt:

55,29 % C, 3,09 % H, 15,14 % S.

Aus dem Studium der Acylderivate des Datiscetins folgt mit Sicherheit, daß es vier Hydroxylgruppen enthält. Es ist isomer mit Luteolin und Fisetin und stellt wahrscheinlich auch ein Flavon oder Favonolderivat dar. Das Studium seiner Konstitution muß auf der Untersuchung seiner Spaltungsprodukte basieren. Die bis jetzt erhaltenen Resultate sind jedoch nicht hinreichend, denn bis jetzt gelang uns unter den Alkalispaltungsprodukten nur Phenol und Salicylsäure nachzuweisen. Wir hoffen jedoch auch diesen Punkt aufklären zu können, da wir dank der Freundlichkeit des Herrn Burkill wieder in den Besitz einer größeren Partie der Wurzeln gelangt sind. —

Die Muttersubstanz des Datiscetins, das Datiscin, wie wir sie mit Stenhouse benennen wollen, nach der schon geschilderten Methode gereinigt zeigte folgende Zusammensetzung:

1. 0,2010 g Subst. gaben 0,4009 g CO_2 und 0,0915 g H_2O
2. 0,2092 „ „ „ 0,4198 „ „ „ 0,0962 „ „
3. 0,2032 „ „ „ 0,4062 „ „ „ 0,0942 „ „
4. 0,1992 „ „ „ 0,3968 „ „ „ 0,0896 „ „
5. 0,2012 „ „ „ 0,4034 „ „ „ 0,0924 „ „

entsprechend

	C		H
1.	54,39 % C	und	5,09 % H
2.	54,73 „ „	„	5,14 „ „
3.	54,52 „ „	„	5,18 „ „
4.	54,33 „ „	„	5,03 „ „
5.	54,68 „ „	„	5,13 „ „
Im Mittel	54,53 % C	und	5,11 % H.

Die analysiierten Präparate wurden bis zum konstanten Gewicht über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Nur in dieser Art getrocknete Proben gaben halbwegs konstante Resultate. Das Trocknen bei höheren Temperaturen ist schädlich, da es eine Zersetzung des Datiscins verursacht.

Wie bereits erwähnt, liefert das Datiscin einen Zucker der im Gegensatz zu dem früher erhaltenen mit Hefe fermentierte, und die nähere Untersuchung desselben zeigte, daß in diesem Falle nicht Rhamnose, sondern d-Glukose vorlag.

Die Spaltung des reinen Glukosids erfolgte auf bekannte Art durch Kochen mit verd. Schwefelsäure. Das Filtrat vom abgeschiedenen Datiscetin wurde mit Baryumkarbonat behandelt und das Filtrat vom $BaSO_4$ eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, von dunkelbraunen Flocken abfiltriert mit Tierkohle entfärbt und folgenden Proben unterworfen: mit Hefe versetzt fermentierte er schnell unter Bildung der gewöhnlichen Produkte, im Polarisationsapparat drehte die Lösung nach rechts, mit essigsaurem Phenylhydrazin erwärmt bildete sich ein gelber Niederschlag, der nach dem Umkristallisieren aus verd. Alkohol bei 204—206° schmolz. Die Analyse der letzteren bestätigte die Annahme, daß Glukosozon vorlag:

1. 0,1076 g Substanz gaben 15,1 ccm bei t=12, p=730
2. 0,1890 „ „ „ 0,4166 g CO_2 und 0,1056 g H_2O

gefunden	berechnet für $C_{18}N_4H_{22}O_4$
C : 60,11 %	60,27 %
H: 6,25 „	6,19 „
N : 15,92 „	15,67 „

Das Ableiten einer Formel für Datiscin macht Schwierigkeiten. Am besten stimmen die erhaltenen Analysenwerte mit der Annahme, daß ein Molekül desselben aus einem Molekül Datiscetin und einem Molekül Glukose zusammengesetzt ist: $C_6H_{12}O_6 + C_{15}H_{10}O_6 = C_{21}H_{22}O_{12}$. Da aber die Glukoside immer unter Abscheidung von Wasser gebildet werden, so ist die Formel rationeller wie folgt zu schreiben:

$$C_{21}H_{20}O_{11} + H_2O$$

d. h. daß das unter obigen Umständen getrocknete Datiscin ein Molekül Kristallwasser zurückhält. Diese Formel ($C_{21}H_{22}O_{12}$) verlangt 54,07 % C und 4,72 % H, während der Mittelwert aus 5

Analysen 54,53 % C und 5,11 % H lautet. Erwähnt sei noch, daß die letzteren Zahlen sehr gut mit den von Stenhouse erhaltenen übereinstimmen; dieser Forscher fand: 54,28 % C und 5,24 % H. Die angenommene Datiscinformel wird endlich auch durch den quantitativen Spaltungsversuch unterstützt. Die Spaltung geschah unter Anwendung von verd. Schwefelsäure, das Datiscetin wurde auf gewogenen Filtern gesammelt und die Glukose polarimetrisch bestimmt.

1. 2,0011 g Datiscin gab. 1,1240 g Datiscetin u. 0,6604 g Glukose.
2. 1,0003 „ „ „ 0,5597 „ „ „ 0,3301 „ „

Diese Werte entsprechen:

1. 56,10 % Datiscetin 33 % Glukose
2. 55,97 „ „ 33 „ „

während die Formel $C_{21}H_{22}O_{12}$ — 61,4 % Datiscetin und 38,6 % Glukose verlangt. Die Übereinstimmung ist also genügend.

Für den Pflanzenphysiologen haben die obigen Untersuchungen der Bestandteile der Datisca Cannabina-Wurzeln vor allem deswegen ein Interesse, weil sie zum ersten Mal sicher beweisen, daß gelbe Farbstoffe der Flavongruppe, oder solche, welche zur letzteren im nahen Verhältnis stehen, im Pflanzenreich auch als Glukoside vorkommen können. Die bisher besonders von Kostanecki mit so großem Erfolg studierten gelben Farbstoffe treten in der Regel als Komponenten von Rhamnosiden auf. Der sichere Beweis, daß Datiscetin ebenfalls zu dieser Gruppe von Farbstoffen gehört, steht allerdings noch aus, aber sein allgemeines Verhalten, besonders auch sein Färbevermögen sprechen sehr für diese Annahme. Mit der weiteren Erforschung der Konstitution des Datiscetins sind wir beschäftigt.

Zur Kenntnis des Chlorophylls.

Mitbearbeitet von P. Koźniewski.

Vor einiger Zeit publizierte R. Willstätter[1]) einige höchstinteressante Beobachtungen, die sich auf die Chlorophyllchemie beziehen und das veranlaßt uns einige unserer neueren Beobachtungen bekannt zu machen, die ebenfalls diesen wichtigen Farbstoff betreffen, obwohl sie noch nicht abgeschlossen sind.

---

[1]) Liebigs Annalen **350**, 1. 1906; **350**, 48. 1906.

Wie der eine von uns[1]) bereits betont hat, ist es angesichts der Tatsache, daß in alkoholischen Rohextrakten grüner Blätter höherer Pflanzen zum mindesten zwei grüne Farbstoffe vorliegen, notwendig zu untersuchen, ob die bis jetzt bekannten Chlorophyllderivate von einer und derselben Substanz herrühren, oder z. T. von dem das eigentliche Chlorophyll begleitenden grünen Farbstoff stammen. Dieser zweite grüne Farbstoff, von dem einen von uns Allochlorophyll benannt[2]), tritt allerdings nur in sehr geringen Mengen auf, und wir glauben kaum, daß die entgegengesetzte Ansicht von Tswett[3]), der seine Schlüsse auf eine neue Methode der Untersuchung von Chlorophyllextrakten stützt, aufrecht zu erhalten sein wird.

Von absolut reinem Chlorophyll kann allerdings so lange nicht die Rede sein, als es im kristallisierten Zustand nicht erhalten sein wird, aber die konsequente Durchführung der Entmischung nach der Methode von Sorby führt, wie der eine von uns mit C. A. Schunck[4]) gezeigt hat, zu einem Produkt, welches in bezug auf den gefärbten Stoff als vollkommen einheitlich zu bezeichnen ist; ob es aber frei von farblosen Verunreinigungen ist, ist allerdings zweifelhaft. Dieser letztere Umstand verhinderte den einen von uns manche schwebenden Fragen in der Chlorophyllchemie, wie beispielsweise bezüglich der Glukosid- oder Lecithinnatur oder des Eisengehaltes experimentell anzugreifen, da die erhaltenen event. positiven Resultate keine bindende Beweiskraft beanspruchen konnten. Vorsicht in dieser Beziehung erschien noch aus diesem Grunde geboten, daß mehrere Chlorophyllforscher, so Monteverde uud Tswett behaupteten, sie hätten die Kristallisation des unveränderten Chlorophylls zustande gebracht. Die häufige Wiederholung der Versuche der genannten Autoren ist allerdings bis jetzt leider resultatlos verlaufen, aber daß die Kristallisation des Chlorophylls, dessen Derivate durch her-

---

[1]) Roscoe-Schorlemmer-Brühls Handbuch der Chemie 8, 890.

[2]) Ebenda 854.

[3]) Ber. deutsch. bot. Geselsch. 24, 385. 1906. Was übrigens Herr Tswett über die spektroskopischen Eigenschaften des Chlorophylls und Allochlorophylls sagt, ist vollkommen falsch. Seine Auslassungen, die gegen den einen von uns und C. A. Schunck gerichtet wurden, sollen an anderer Stelle zurückgewiesen werden.

[4]) Journ. Chem. Soc. 77, 1080. 1900.

vorragender Kristallisationsfähigkeit ausgezeichnet sind, doch einmal gelingen wird, erscheint uns sicher, um so mehr als der eine von uns unter später näher zu beschreibenden Bedingungen Gebilde erhalten hat, die bereits an die sogenannten Kristalle des Chlorophyllans erinnern und trotzdem den eigentlichen Chlorophyllcharakter nicht eingebüßt haben.

In der vorliegenden Mitteilung soll die Umwandlung des vom Allochlorophyll und den gelben Lipochromen befreiten Chlorophylls besprochen werden. Diese Pflanze eignet sich zu derartigen Versuchen ganz besonders, aber leider ist das Material schwer in größeren Mengen zu beschaffen, da dieser Ficus in unserem Klima nur in Treibhäusern gut gedeiht.

Die Reinigung geschah in folgender Art. Ein mit 96%igem Alkohol erhaltener Extrakt wurde zunächst mit soviel Wasser verdünnt, daß die Lösung einem Gehalt von 82% Alkohol entsprach, und dann mit dem gleichen Volum reinen Schwefelkohlenstoff durchgeschüttelt. Nach dem Trennen beider Flüssigkeitsschichten wird der Schwefelkohlenstoff, in welchem der Hauptteil des Chlorophylls gelöst ist, mit dem gleichen Volum 82%igen Alkohol durchgeschüttelt. Letzterer nimmt den größten Teil des Allochlorophylls und der Lipochrome auf und wird von dem CS_2 abgetrennt. Die rückständige Schwefelkohlenstofflösung wird noch dreimal mit dem gleichen Volum 82% Alkohol gewaschen und der letzte alkoholische Extrakt auf die Abwesenheit des Allochlorophylls untersucht und zwar indem durch Wasserzusatz die Abscheidung des gelösten Schwefelkohlenstoffs und mit ihm der Farbstoffe verursacht wird. Die spektoskopische Untersuchung dieser CS_2-Lösung beantwortet die Frage sofort, d. h. die Abwesenheit des Allochlorophylls wird sich durch das Fehlen seines Bandes im Rot und die Abwesenheit der Lipochrome eines Bandes vor der Linie F verraten[1]). Die das nun reine Chlorophyll enthaltende CS_2-Lösung wird im Vakuum bei gelinder Wärme verdampft, der Rückstand in Äther gelöst und mit konz. Salzsäure durchgeschüttelt. Hierbei wurde ganz wie im Falle von Chlorophylllösungen eine salzsaure Phyllocyaninlösung und eine ätherische Phylloxanthinlösung mit den charakteristischen optischen Eigen-

[1]) Näheres siehe die Abhandlung von Marchlewski und C. A. Schunck a. a. O.

schaften erhalten. Es unterliegt demnach unserer Meinung nach keinem Zweifel, daß das Phylloxanthin und Phyllocyanin von einer und derselben Substanz abstammen. Es schien uns jedoch, als ob die Menge des gebildeten Phytloxanthins geringer war als bei Anwendung von Rohchlorophylllösungen. Wir beabsichtigen daher, soweit dies möglich ist, bei weiteren Versuchen die relativen Mengen beider genannten Chlorophyllderivate zu bestimmen.

Eine andere Frage ist die nach der Umwandlungsfähigkeit des Phylloxanthins in Phyllocyanin. Bekanntlich löst sich ersteres viel schwieriger in konz. Salzsäure als Phyllocyanin, und darauf beruht eben die Trennung beider Substanzen. Wird jedoch Phylloxanthin längere Zeit in Berührung mit Salzsäure gelassen, so löst es sich ebenfalls mit grünblauer Farbe, und wurde daher schon von E. Schunck[1]) die Frage diskutiert, ob bei dieser Lösung nicht eine Umwandlung der Phylloxanthins in Phyllocyanin stattfindet. Die damaligen Versuche führten zu einem negativen Resultat. Späterhin wurde von Schunck und dem einen von uns der Versuch wiederholt[2]) und die Umwandlung des Phylloxanthins in eine Substanz, die dasselbe Spektrum besaß als Phyllocyanin, war zweifellos, leider war aber das damals benutzte Phylloxanthin aus einer unbestimmten Chlorophylllösung erhalten worden, die dem gewöhnlichen Rasengrase entstammte. Der eine von uns hatte nun bereits im Jahre 1901 die Beobachtung gemacht, daß das aus Ficus Repens dargestellte Phylloxanthin sehr resistent ist und sich der Wirkung der Säuren widersetzt. Den Versuch haben wir jetzt wiederholt, indem wir mit Phylloxantin arbeiteten, welches von Allochlorophyll und den Lipochromen befreit waren.

Das Phylloxanthin wurde in ätherischer Lösung mit konz. Salzsäure gemischt und in die Lösung ein Strom von trockenem HCl geleitet. Der größte Teil des Äthers wurde dabei verjagt und die dunkelgrüne Lösung blieb drei Tage lang verschlossen bei gewöhnlicher Temperatur. Sodann wurde die Lösung in Wasser gegossen und mit Äther extrahiert. Erhalten wurde eine braungrüne Flüssigkeit mit deutlich rotem Stich, die dasselbe Spektrum aufwies, wie das unveränderte ursprüngliche Phylloxanthin. Eine Umwandlung hat also bei gewöhnlicher Temperatur nicht statt-

---

[1]) Proc. Roy. Soc. **50**, 309. 1891.

[2]) Liebigs Annalen **248**, 101. 1894.

gefunden. Ob ein mäßiges Erwärmen hierzu nötig ist, werden wir bald entscheiden.

Es war notwendig, auf diesen Punkt schon jetzt einzugehen, da von der endgültigen Lösung der Frage nach der Umwandlungsfähigkeit des Phylloxanthins in Phyllocyanin das Verständnis der Säurespaltung des Chlorophylls abhängt. Die Säurewirkung beruht, unter anderem, entweder auf einer Spaltung der Chlorophyllmolekel in zwei gefärbte Anteile, Phylloxanthin und Phyllocyanin, oder beide genannte Körper sind zwei verschiedene Stufen desselben Vorganges. Die Frage wird sich wohl auch durch das eingehende Studium des Alkachlorophylls mehr aufklären lassen. Dasselbe muß als Verseifungsprodukt des Chlorophylls aufgefaßt werden und es ist sehr gut möglich, daß durch Säurespaltung aus demselben ebensolche oder doch sehr ähnliche Stoffe entstehen werden wie aus den ursprünglichen Säurespaltungsprodukten durch die Einwirkung von Säuren.

Zu den hier berührten Fragen hoffen wir bald zurückkehren zu können.

Über die Verteilung des Jods bei tuberkulösen Tieren.

Von

Priv.-Doz. Dr. Oswald Loeb, und **Dr. Louis Michaud,**

Assistent am med.-chem. Institut. ehem. Assistent am hygienischen Institut.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie und Pharmakologie der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1906.)

P. Ehrlich[1]) hat wiederholt auseinandergesetzt, daß die Verteilung der Arzneistoffe im Organismus das Bindeglied zwischen der chemischen Konstitution und der pharmakologischen Wirkung bildet. Für das Verständnis der letzteren ist die Kenntnis der Verteilung notwendig. Hierfür betrachtet er als den geeignetsten Weg die Verwendung von Farbstoffen, die leicht makro- und mikroskopisch verfolgt werden können. Er betont auch die Wichtigkeit der gewöhnlichen quantitativen Methoden, die aber bei den meisten Stoffen nicht anwendbar sind.

S. Bondi und M. Jakoby[2]) haben neuerdings ausgeführt, daß die Farbstoffmethode insofern ihre Begrenzung hat, als kein Aufschluß über quantitative Verhältnisse erhalten wird. Sie selbst untersuchten die Verteilung eines Stoffes, der eine quantitative Bestimmung zuläßt, die Salizylsäure. Sie arbeiteten eine neue quantitative Methode aus und fanden im Blut, den Gelenken und Muskeln die Hauptmengen der Salizylsäure verteilt, während die Knochen zurückstanden. Im Blut war die größte Menge vorhan-

---

[1]) P. Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus **1885**. Berlin. Hirschwald. Über die Beziehungen zur chemischen Konstitution, Verteilung und pharmakol. Wirkung. Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung **1904**, 573 bis 628.

[2]) Bondi und Jakoby, Über die Verteilung der Salizylsäure bei normalen und infizierten Tieren. Hofmeisters Beiträge **7**, 514, H. 10/11.

den, in den Gelenken mehr als in den Muskeln. Bei Tieren, die mit Bouillonkulturen von Staphylococcus aureus infiziert worden waren und deutliche Gewichtsabnahme darboten, fand sich in den Gelenken eine größere Menge Salizylsäure als in denjenigen der gesunden Tiere.

Hiermit scheint ein neues Prinzip gefunden zu sein, indem die Verteilung eines Stoffes durch die Erkrankung des Organismus modifiziert wird.

Jakoby vergleicht diese Beobachtung mit den von Ehrlich durch die Farbstoffmethode gefundenen Tatsachen, wonach u. a. Methylenblau gewisse Nervenendigungen erst dann färbt, wenn gewisse an sich nicht tingierende Farbstoffe der Triphenylmethanreihe der Infusionslösung zugefügt werden und dadurch das chemische Milieu der betreffenden Apparate verändert worden ist.

Dieses Beispiel zeigt uns eine Änderung der normalen Verteilung unter veränderten chemischen Bedingungen.

Nachdem der eine von uns (L.)[1]) die Verteilung des Jods im normalen Organismus gezeigt hat, lag es nahe, die Frage aufzuwerfen, ob erkrankte Gewebe eine andere Affinität zu Jodverbindungen haben als gesunde.

Bei Injektion von Jodiden in den gesunden Organismus bleiben Gehirn, Rückenmark, Fett und Knochenmark gewöhnlich jodfrei; die geringste Jodmenge enthält der Muskel und dann folgen in steigender Reihenfolge: Leber, Lymphdrüsen, Nieren und Speicheldrüsen, Lunge und an höchster Stelle steht das Blut. Unverhältnismäßig viel Jod enthält die Schilddrüse, wie schon Baumanns[2]) Entdeckung gezeigt hat, sie übertrifft die genannten Gewebe um das Vielfache. Die normale Jodverteilung zeigt sich jedoch abhängig vom chemischen Aufbau des Präparates, das verwendet wird. Führt man das Jod an lipoidlösliche Körper gekuppelt zu, so kann man es im Gehirn, Rückenmark und Fett nachweisen. Solche Neurotropie, resp. Lipotropie zeigt z. B. das Jod in Jodoform und Jodäthyl. Eine fernere Modifikation der Verteilung kommt zustande durch den verschiedenen Ausscheidungsort. So z. B. zeigt es sich, daß Jodäthyl besonders reichlich

[1]) O. Loeb, Die Jodverteilung nach Einfuhr verschiedener Jodverbindungen. Arch. f. Path. u. Pharmak. 56, 320.

[2]) Baumann, Über das normale Vorkommen von Jod im Tierkörper. 1. Mitteil. Hoppe-Seylers Ztschr. 21, 319.

in der Lunge gefunden wird, da es ja als gasförmiger Körper daselbst z. T. ausgeschieden wird.

Da uns weder tertiäre luetische Affektionen, noch aktinomykotische Granulationsgeschwülste, noch Tumoren und andere pathologische Prozesse, auf die Jod therapeutisch wirkt, zu Gebote standen, so nahmen wir tuberkulöse Tiere, da ja für das Jod eine spezifisch-therapeutische Wirkung auf Skrofulose wie auf echte tuberkulöse Prozesse, z. B. Solitärtuberkel des Gehirns bei Kindern sichergestellt ist. So hatten wir eine Grundlage für unsere Versuchsanordnung.

Die Versuchsanordnung und die Jodbestimmungsmethode sind kurz folgende:

Die verwendeten Kaninchen waren vor sechs Monaten durch Injektion von Tuberkelbazillen in die vordere Kammer des einen Auges infiziert worden. Das betreffende Auge war so stark tuberkulös verändert, daß in zwei Fällen, in denen gegenüber dem anderen normalen Auge ein Gewichtsunterschied von fast 2 g bestand, es fast vollständig in tuberkulösen Käse umgewandelt war, während in den drei anderen Fällen, wo Gewichtsgleichheit bestand, die Linse, der Glaskörper und z. T. die Iris neben dem Käse, der hauptsächlich in der Cornea und Uvea saß, noch erhalten waren.

Gleichzeitig wurden bei diesen Kaninchen Teile der übrigen Organe untersucht und der Jodgehalt der tuberkulösen Teile im Vergleich zu dem der gesunden festgestellt.

Außerdem haben wir auch Meerschweinchen benutzt, die im bakteriologischen Institut zu diagnostischen Zwecken tuberkulös infiziert worden waren und relativ große Drüsenschwellungen aufwiesen.

Den Kaninchen wurde 0,45, resp. 0,48 und 0,79 und in einem Falle (Versuch IV) an mehreren Tagen dreimal je 0,5 g Jodkali pro kg Tier, den Meerschweinchen wurde 0,63 bis 0,8 g Jodoform und 1,0 ccm Jodäthyl pro 1 kg Tier an einer Körperstelle injiziert, die möglichst weit von den Drüsen entfernt war. Die Kaninchen, denen Jodkali injiziert worden war, wurden 5 bis 6 Stunden nach der Injektion getötet, die Meerschweinchen, die Jodoform erhalten hatten, nach 23 resp. 30 Stunden; das Jodäthyl-Meerschweinchen in Versuch VII 9 Stunden nach der Injektion, während das letzte Jodäthyl-Meerschweinchen (Versuch VIII) 22 Stunden nach der Injektion verendete.

Die Tiere wurden durch sorgfältiges Verbluten aus der Carotis getötet. Nur im letzten Versuch war eine Blutbestimmung durch den spontanen Tod des Tieres unmöglich.

Die tuberkulösen Teile wurden von den umgebenden normalen Geweben frei präpariert. Die Untersuchungsobjekte wurden gewogen, zerkleinert und sofort nach der von Baumann für die Jodbestimmung in der Schilddrüse ausgearbeiteten Methode behandelt.

Wir haben nun gefunden, daß in tuberkulösen Geweben mehr Jod gespeichert wird als in den gesunden.

Die folgenden Versuchsprotokolle und Tabellen sollen als Belege dienen. Der Jodgehalt ist in mg Jodkali berechnet.

Versuch I. Kaninchen 2210 g. Infektion vor 6 Monaten.
28. V. 06. 12 Uhr 40 Min.: Injektion von 1,0 Jodkali subkutan.
6 „ : Verbluten aus der Carotis.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Blut	7,23	0,5
Fett	2,28	?
Muskel	3,62	0,1
Leber	3,95	0,14
Gesunde Lunge	2,54	0,24
Tuberkulöse Lunge	2,14	0,36
Gesundes Auge	3,60	0,21
Tuberkulöses Auge	3,50	0,58

Versuch II. Kaninchen 1850 g. Infektion vor 6 Monaten.
4. VI. 06. 12 Uhr: Injektion von 0,9 g Jodkali subkutan.
5 „ 30 Min.: Verbluten aus der Carotis.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Blut	9,80	0,40
Muskel	4,09	0,08
Leber	3,82	0,11
Relativ gesunde Lunge mit vereinzelten miliaren Knötchen	1,40	0,16
Lunge mit miliaren Knötchen	3,21	0,24
Caverne mit Käse	6,05	0,30
Tbk. verkäste Lunge	4,52	0,47
Gesundes Auge mit Iristbk.	3,25	0,22
Tuberkulöses Auge	1,31	0,44

Versuch III. Kaninchen 1260 g. Infektion vor 6 Monaten.

31. V. 06. 12 Uhr 30 Min.: Injektion von 1,0 g Jodkali subkutan.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Blut	9,40	0,68
Muskel	4,20	0,06
Leber	4,03	0,11
Gesunde Lunge	3,21	0,35
Tbk. Lunge + verkäste Mediastinal-Lymphdrüse	1,04	0,66
Gesundes Auge	3,20	0,31
Tuberkulöses Auge	3,22	0,48

Versuch IV. Kaninchen 1980 g. Infektion vor 6 Monaten.

13. VI. 06. 12 Uhr 30 Min.: Injektion von 1,0 g Jodkali subkutan.
14. VI. 06. 3 „ : „ „ 1,0 „ „ „
15. VI. 06. 12 „ : „ „ 1,0 „ „ „
15. VI. 06. 6 „ 15 Min. nachm.: Entbluten aus der Carotis.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Blut	8,72	0,23
Gesundes Auge	3,5	0,22
Tuberkulöses Auge	3,1	0,31

Versuch V. Meerschweinchen. Infektion vor ca. 3 Monaten.

26. VI. 06. 12 Uhr: Injektion von ca. 0,4 g Jodoform in Olivenöl subkutan.
27. VI. 06. 6 „ : Verbluten aus der Carotis.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Blut	10,10	0,144
Muskel	2,62	0,05
Leber	2,94	0,06
Niere	3,30	0,16
Lunge	1,13	0,15
Tuberkulöse verkäste Drüse	1,86	0,44

Versuch VI. Meerschweinchen 470 g. Infektion vor ca. 3 Monaten.

4. VI. 06. 5 Uhr 20 Min.: Injektion von 0,3 g Jodoform in 10 ccm Olivenöl subkutan.
5. VI. 06. 4 „ : Verbluten aus der Carotis.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Blut	6,80	0,11
Leber	4,00	0,03
Milz	1,17	0
Lunge	1,90	0,06
Tuberkulöse Inguinaldrüsen	3,91	0,13

Versuch VII. Meerschweinchen. Infektion vor ca. 3 Monaten.

26. VI. 06. 12 Uhr mittags: Injektion von 0,5 ccm Jodäthyl subkutan.
26. VI. 06. 9 „ abends: Verbluten aus der Carotis.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Blut	3,5	0,34
Leber	3,3	0,05
Lunge	1,37	0,12
Tuberkulöse Lymphdrüsen	4,24	0,26

Versuch VIII. Meerschweinchen 470 g. Infektion vor ca. 3 Monaten.

4. VI. 06. 5 Uhr 25 Min.: Injektion von 0,5 ccm Jodäthyl.
5. VI. 06. 3 „ Tier verendet.

Organ	Verbrannte Menge in g	mg Jodkali pro 1 g Substanz
Muskel	2,60	0
Leber	4,43	0,26
Tuberkulöse Inguinaldrüse	3,50	0,40

Bei den mit Jodkali behandelten Kaninchen enthielt das tuberkulöse Auge in Versuch I 2 $^3/_4$ mal soviel wie das gesunde, in Versuch II 2 mal, in Versuch III und IV 1 $^1/_2$ mal soviel.

In den Versuchen I, II und IV überstieg der Jodgehalt des tuberkulösen Auges denjenigen des Blutes, der beim normalen Tier mit Ausnahme der Schilddrüse der höchste ist.

Der Jodgehalt der tuberkulösen Lungen übertraf denjenigen der gesunden Lungen in Versuch I um das 1 1/2 fache, in Versuch II fast um das 3 fache, in Versuch III fast um das Doppelte.

In Versuch II zeigte es sich, daß mit zunehmender tuberkulöser Veränderung der Jodgehalt auch zunahm; denn die Lungenpartien mit einzelnen oder mit Gruppen kleiner miliarer Tuberkelknötchen hatten auffallend weniger Jod als diejenigen, die vollständig in Käse umgewandelt waren.

Die tuberkulös veränderte Lunge kann soviel Jod aufspeichern, daß sie das Blut erreicht (Versuch III) und sogar übertrifft (Versuch II).

Bei den subkutan infizierten Meerschweinchen fiel die vergleichende Untersuchung der Augen natürlich weg; ebenso konnte, da die Lungen nur in geringem Grade erkrankt waren, eine vermehrte Jodspeicherung dort nicht erwartet werden; wir mußten uns auf die Untersuchung der stark verkästen Lymphdrüsen beschränken, die eine auffallend größere Menge Jod absorbiert hatten als die übrigen Organe.

In Versuch V (Jodoform) enthielt die tuberkulöse Lymphdrüse 3 mal soviel Jod wie die Lunge und Niere, 9 mal soviel wie die Muskeln und 7 mal soviel wie die Leber und übertraf den Jodgehalt des Blutes um das 3 fache, das sonst immer an höchster Stelle steht. In Versuch VI enthielt die tuberkulöse Lymphdrüse doppelt soviel Jod wie die Lunge, viermal soviel wie die Leber und ungefähr eben soviel wie das Blut.

In Versuch VII (Jodäthyl) übertraf die tuberkulöse Lymphdrüse an Jodgehalt die Lunge um mehr als das doppelte, die Leber um das 5 fache, blieb jedoch hinter dem Jodgehalt des Blutes zurück. In Versuch VIII hatte die tuberkulöse Lymphdrüse 1 1/2 mal soviel Jod absorbiert als die Leber.

In sämtlichen Fällen war also eine beträchtliche Ablenkung der injizierten Jodverbindungen in die tuberkulös erkrankten Organteile vorhanden.

Von Interesse war die Frage, ob das in den tuberkulösen Organen gespeicherte Jod daselbst in organischer Bindung sich befindet oder nicht.

Wir injizierten 19 Meerschweinchen mit Drüsenschwellungen an vier verschiedenen Tagen mit Intervallen von 2—4 Tagen jeweilen 0,5 g Jodkali pro kg Tier; 48 Stunden nach der letzten

Injektion wurden die Tiere durch Verbluten aus der Carotis getötet. Die fein zerhäckelten Organe wurden für 24 Stunden in Alkohol gebracht, der Alkohol abfiltriert, der Rückstand auf dem Wasserbade getrocknet und pulverisiert, dann im Soxlethschen Extraktionsapparat solange mit Alkohol extrahiert, bis die Extraktionsflüssigkeit keine Jodreaktion mehr gab. Hierauf wurde der Rückstand nach der gleichen Methode wie in den obigen Versuchen verbrannt und auf Jod untersucht. Findet man in diesem Falle Jod, so ist anzunehmen, daß es in organischer Eiweißverbindung vorlag. Zur Kontrolle wurde Blut und Leber der Tiere ebenso behandelt und auf Jod untersucht.

Unsere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß sowohl die tuberkulösen Drüsen, wie in diesem Falle auch die Leber und das Blut nach der Alkoholextraktion vollständig jodfrei waren. Eine in Alkohol unlösliche organische Jodverbindung war also nicht nachweisbar.

Zusammenfassung.

Wir haben gezeigt, daß tuberkulöses Gewebe Jodverbindungen in verstärktem Maße absorbiert. Hiermit ist eine weitere Stütze für die Jakobysche Hypothese (Ablenkung von Arzneistoffen in das erkrankte Gewebe) gefunden worden.

Die erkrankten tuberkulösen Gewebe enthalten dieses Jod nicht in einer in Alkohol unlöslichen organischen Verbindung.

Den Herren Professoren Tavel und Kolle und Herrn Kollegen Dr. Tomarkin sind wir für die Überlassung der tuberkulösen Tiere zu Dank verpflichtet.

Über die Anwendung von Antiseptiken bei Untersuchungen über Enzyme.

Von

A. J. J. Vandevelde (Gent-Belgien).

(Eingegangen am 26. Januar 1907.)

Viele Untersuchungen über Enzyme haben zu fehlerhaften und nicht übereinstimmenden Ergebnissen geführt; die untersuchten Flüssigkeiten sind immer bakterienhaltig, und von diesen Bakterien werden Enzyme abgeschieden, welche z. B. Milchkaseine und Gelatine [1]), auf gleiche Weise wie das proteolytische Enzym [2]) der Milch zu proteolysieren vermögen. Darum wurden von den meisten Forschern sterile Untersuchungsböden benutzt, oder es wurden durch Anwendung von Antiseptiken diese Böden sterilisiert.

Da die meisten Enzyme durch eine Temperaturerhöhung vernichtet werden, ist es nicht möglich, mittels Wärme sterile Enzympräparate zu bekommen; mit gewissen Antiseptiken wird nun versucht, die Wirkung von Bakterien zu unterdrücken, ohne der Wirkung der Enzyme zu viel zu schaden.

Verschiedene chemische Verbindungen können bei solchen Untersuchungen nicht angewandt werden; mit Formol z. B. werden in Flüssigkeiten die Bakterien sehr leicht vernichtet, aber es ist auch keine Enzymwirkung möglich; die meisten Phenole und Alkohole sind gegenüber Enzymen gleichfalls schädlich. Schon in 1894

---

[1]) Von H. De Waele und von mir wurde die Auflösung von Milchkasein und von Gelatine durch B. pyocyaneus, B. anthracis, B. megatherium, B. typhosus, B. Coli usw. untersucht. (Centr. Bakt. I, **39**, 353 bis 357. 1905).

[2]) A. J. J. Vandevelde, H. De Waele u. E. Sugg. Beitr. chem. Physiol. und Pathol. **5**, 571. 1904.

wurde von Schwiening[1]) auf die ungünstige Wirkung von Thymol, Fluornatrium und Chloroform auf Autolyseerscheinungen bei tierischen Geweben berichtet. Säuren, alkalinische Basen, die meisten Salze, wie Chlorquecksilber, Silbernitrat, können nur mit großen Schwierigkeiten angewandt werden, da sie chemisch auf das zu untersuchende Material reagieren.

Stoklasa[2]) und seine Schüler haben über die Wirkung von Enzymen und enzymähnlichen Substanzen verschiedene Mitteilungen veröffentlicht; ihre Untersuchungen wurden unter Anwendung von Toluol und von Thymol ausgeführt.

Thymol übt auf die Sterilisierung bei einer Temperatur von 38—40° C keine echte Wirkung, wie dieses von Mazé[3]) und auch von mir beobachtet wurde. Toluol schadet den Enzymwirkungen nicht, doch ist es gewöhnlich kein bakterientötendes Mittel. Jedoch teilt Hildebrandt[4]) mit, es sei ihm gelungen mit einem großen Toluolüberschuß, nach mehrstündigem Schütteln und nachdem er eine Toluolschicht über die Flüssigkeit gegossen hatte, ganz keimfreie Präparate zu bereiten. Gewöhnlich ist demnach Toluol nicht zu empfehlen, wie es auch durch meine Untersuchungen bewiesen wurde; darum wurden auch die Ergebnisse der Stoklasaschen Untersuchungen von Mazé[5]) und von Weigmann, Höft und Gruber[6]) bezweifelt.

Mit Chloroform sind die Bakterien nur einige Tage geschwächt, derart, daß dieses Reagens nur für eine kurze Aufbewahrung[7]) dienen kann, dagegen nicht für eine lange.

---

[1]) Virch. Arch. **136**, 444. 1894.

[2]) Chem. Ber. **36**, 622 bis 634 und 4058 bis 4069. 1903. 5. Intern. Kongr. angew. Chemie. Berlin **1903**, Ber. III, 505 bis 518. Centr. Physiol. **16**, 712 u. **17**, 209, 465. 1903. Arch. Ges. Physiol. **101**, 311 bis 339. 1904. Beitr. chem. Physiol. **3**, 460 bis 509. 1903. Ztschr. Zuckerind. Böhm. **27**, 633 bis 662. 1903. Arch. Hyg. **50**, 169 bis 182. 1904. Ztschr. landw. Vers. West. Oest. **7**, 755 bis 744. 1904. Bot. Ber. **22**, 358. 1904.

[3]) Ann. Inst. Pasteur, **18**, 378 bis 381. 1904.

[4]) Beitr. chem. Physiol. **5**, 463 bis 475. 1904.

[5]) Ann. Inst. Pasteur **18**, 382 bis 384 und 538 bis 544. 1904.

[6]) Chem. Zeitung **29**, 408. 1905.

[7]) Nach H. Van Laer (Bull. denr. aliment. **1901**, 280) kann eine mit Chloroform versetzte diastatische Malzauflösung nicht länger als 15 Tage aufbewahrt werden.

Untersuchungen über enzymatische Wirkungen in der Milch unter Anwendung von Antiseptiken sind schwer auszuführen, da Milch aus einer wässerigen Auflösung mit emulsionierten Fettkörperchen zusammengesetzt ist. Wenn man Milch mit Toluol, Chloroform usw. versetzt, löst sich das Fett in diesen Reagentien leicht, aber es mischen sich diese Antiseptica mit der wässerigen Flüssigkeit nicht; daher ist die Wirkung selbst unzureichend. Andere Antiseptiken üben eine umgekehrte Wirkung, da sie sich in der Flüssigkeit auflösen, dagegen im Fette nicht.

Mit Keton kann eine Lösung in Fett wie auch in Wasser und wässerigen Flüssigkeiten entstehen, doch ist Keton allein kein ausreichend antiseptisch wirkender Stoff. Diese Verbindung kann jedoch mit gutem Erfolg benutzt werden, wie ich aus meinen Untersuchungen konstatieren konnte, wenn sie erst mit Jodoform versetzt wird; wenn eine Jodoformlösung in die Milch oder eine andere Flüssigkeit eingebracht wird, so löst sich Keton leicht in dieser Flüssigkeit auf und das Jodoform wird als fein pulverige Masse in der ganzen Flüssigkeit niedergeschlagen. Folglich übt das Jodoform, welches gewöhnlich als unlöslicher Stoff ein sehr geringes antiseptisches Vermögen besitzt, eine sehr starke Wirkung auf die Bakterien, welche ganz vernichtet werden, ohne den zu untersuchenden Enzymen zu schaden.

Meine Untersuchungen mit H. De Waele und E. Sugg[1]) haben zu dem Schluß geführt, daß die mit Wasserstoffhyperoxyd und ferner mit Katalase versetzte Kuhmilch ganz sterilisiert werden kann, und daß außerdem die letzten Spuren des Wasserstoffhyperoxyds verschwinden können. Solche sterile rohe Milch ist natürlich bei Enzymuntersuchungen sehr empfehlenswert, doch ist der Gebrauch derselben bei zahlreichen Proben, nämlich wenn verschiedene Milchsorten zugleich zu untersuchen sind, nicht leicht zu handhaben; in meinen jüngsten Untersuchungen habe ich die Ketonjodoformmethode gewählt.

Ich habe als vorläufige Untersuchungen zentrifugierte Kuhmilch C 207 und C 208 mit Chloroform, Toluol, Xylol, Keton, thymolhaltigem Keton, Thymol und jodoformhaltigem Keton versetzt. In sterilisierten, mit Wattepfropfen geschlossenen Röhren habe ich 25 ccm der zu untersuchenden Milchsorten gebracht, mit

---

[1]) Beitr. chem. Physiol. **5**, 571. 1904. Centr. Bakt. I, **18**, 30 bis 38. 1904.

dem Antiseptikum versetzt und kräftig geschüttelt, im Schrank bei 37,5° C verschiedene Tage bewahrt und ferner jeden Tag zweimal kräftig geschüttelt.

In je 25 ccm Milch C 207, und immer doppelt ausgefertigt, wurden die folgenden Mengen Stoffe gebracht: 3 ccm und 1,5 ccm Chloroform, 3 ccm und 1,5 ccm Toluol, 3 ccm und 1,5 ccm Xylol, 5 ccm und 2,5 ccm Dimethylketon, 1 ccm und 0,5 ccm einer 1 %tigen Thymolauflösung in Dimethylketon, 0,1 g und 0,05 g Thymolpulver.

Für je 25 ccm Milch C 208 wurden, auch immer doppelt, gebraucht: 5 ccm Toluol, 5 ccm Chloroform, 3,3 ccm, 6,6 ccm, 10 ccm, 13,3 ccm und 16,6 ccm einer 3 %igen Jodoformauflösung in Dimethylketon, welche Mengen mit 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g und 0,5 g Jodoform für 25 ccm Milch übereinstimmen.

Nach sechs Tagen wurden die Röhren mit der Milch C 207 mikroskopisch und mit Bouillonröhren bakteriologisch untersucht, und es wurde gefunden, daß sie mit Bakterien infiziert waren.

Die Milch C 208 wurde zugleich bakteriologisch untersucht und die Mengen der Proteine bestimmt. Nach fünf Tagen waren die mit Toluol und mit Chloroform versetzten Milchröhren stark infiziert; dagegen waren die mit Jodoformketon versetzten Milchproben selbst noch nach 15 Tagen und mehr steril geblieben. Eine Menge von 0,1 g Jodoform für 25 ccm Milch ist demnach schon für eine gute Bewahrung genügend. Eine größere Menge ist jedoch für Enzym-Wirkungen schädlich. Bei derselben Milch C 208, welche eine prozentige Menge von 3,6656 g Protein enthält, wurde nach 5 und 15 Tagen in den mit den oben mitgeteilten Mengen Jodoformketon versetzten Proben die folgenden prozentigen Proteinmengen gefunden.

Milch C 208 : 3,6656 GV.%

Für 100 ccm Milch		Nach 5 Tagen GV.%	Nach 15 Tagen GV.%
ccm Jodoformketonauflösung 3 %	g Jodoform		
16,6	0,4	2,4796	1,9044
33,3	0,8	2,5444	2,1268
50,0	1,2	2,9956	2,2440
66,6	1,6	3,1436	3,0836
83,3	2,0	3,4336	3,3132

Diese Dosierung geschah durch Erwärmen der mit Wasser verdünnten und mit Essigsäure versetzten Milch und Waschen des Niederschlages mit Wasser, Alkohol und Äther, auf welche Weise das Jodoform ganz entfernt wurde. Bei Anwesenheit von Jodoform ist demnach die Proteolyse der Proteide möglich, in ähnlicher Weise wie ich früher mit De Waele und Sugg[1]) fand, aber es wird auch durch Erhöhen der Konzentration des Jodoforms die Proteolyse verzögert. Mit einer Menge von 0,4 g in Keton aufgelöstem Jodoform wird keine Schädigung in der Enzymwirkung konstatiert, und zugleich ist eine volle Sterilität gesichert.

Demnach ist es möglich, unter sehr günstigen Bedingungen Untersuchungen über Enzyme anzustellen, und ich werde bald meine Ergebnisse damit über Proteolase, Lipase, Salolfermente, zuckerspaltende und niederschlagende Enzyme mitteilen.

---

[1]) A. a. O., Beitr. chem. Physiol. **5**, 571. 1904.

Ein weiterer Beweis der chemischen Verwandtschaft des Chlorophylls und Blutfarbstoffs.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

L. Marchlewski.

(Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften zu Krakau.)

(Eingegangen am 3. Januar 1907.)

Zu den vielen Beweisen der chemischen Verwandtschaft des Chlorophylls und Blutfarbstoffs kann ich heute einen neuen, und wie ich glaube, interessanten zufügen.

Die Muttersubstanz des Hämatoporphyrins, das Hämin, ist bekanntlich eine Eisenverbindung von sehr charakteristischen chemischen und physikalischen Eigenschaften. Das Eisen ist in demselben stark gebunden, „maskiert" und kann nur durch sehr energische Eingriffe abgetrennt werden, wobei das Hämatoporphyrin entsteht. Hämin steht dem Hämoglobin insofern sehr nahe, als es glatt bei der Hydrolyse desselben abgespalten wird und den färbenden Komplex enthält. Bemühungen, das Hämin oder das aus demselben durch Alkaliwirkung entstehende Hämatin aus dem Hämatoporphyrin zu rekonstruieren, scheinen in der letzten Zeit mit positiven Resultaten gekrönt worden zu sein. Laidlaw[1]) will auf einfachem Wege zum Hämatin gelangt sein, während die interessante Abhandlung von J. Zaleski[2]) Andeutungen in derselben Richtung enthält. Letzterer Forscher erhielt aus dem Mesoporphyrin eine Eisenverbindung, die sich sehr ähnlich wie das

---

[1]) Journal of Physiol. **1904**, 464.

[2]) Ztschr. f. physiol. Chem. **48**, 11. 1904.

Hämin verhielt und eine Zusammensetzung, entsprechend der Formel $C_{34}H_{36}O_4N_4FeCl$, besaß. Diese neue Verbindung, von Zaleski hydrogenisiertes Hämin benannt, besitzt nach ihm ein Spektrum, welches dem des eigentlichen Hämins sehr ähnlich ist. Es enthält dieselben Bänder, nur etwas mehr nach Violett hin verschoben. Durch Spaltung mit Bromwasserstoffsäure in essigsaurer Lösung liefert das hydrogenisierte Hämin Mesoporphyrin. Die vollständige Übereinstimmung der Eigenschaften der beiden Blutfarbstoffporphyrine und des Phylloporphyrins, besonders auch in Bezug auf die leichte Bildung von Metallverbindung mit einigen zweiwertigen Metallen wie Zink, welche ganz analoge spektroskopische Eigenschaften besitzen, machte es sehr wahrscheinlich, daß Phylloporphyrin auch eine dem Hämin ähnliche Eisenverbindung liefern wird. Ich habe mich in meiner Vermutung nicht getäuscht, es gelingt in der Tat leicht, aus dem Phylloporphyrin eine Verbindung zu erhalten, die in ihrem Verhalten dem Hämin täuschend ähnlich ist.

Bei der Darstellung dieses „Phyllohämins", wie ich die Substanz vorläufig bezeichnen will, verfuhr ich ganz analog wie Zaleski bei der Darstellung des hydrogenisierten Hämin, nur konnte ich nicht nach genau anzugebenden Mengeverhältnissen arbeiten, da ich vorläufig den Versuch nur in sehr geringem Maßstabe ausführen konnte.

Phylloporphyrin wird in warmem Eisessig, der mit Kochsalz gesättigt war, gelöst, wobei es sofort in Salzsäure-Salz umgewandelt wird, und zu dieser Lösung in 50%igen Essigsäure gelöstes Mohrsches Salz zugesetzt und das Gemisch einige Zeit auf dem Wasserbade erwärmt. Die ursprüngliche wunderschöne kirsch-rote Lösung des Phylloporphyrinchlorhydrates wird alsbald geändert, sie bekommt einen braunen Stich, und dieser Farbenumschlag wird immer deutlicher, bis endlich eine Lösung entsteht, deren Farbe von der des Hämins nicht zu unterscheiden ist; sie ist höchstens eine Idee röter. Sobald weiteres Erwärmen und Eisenzusatz auf die Farbe von keinem Einfluß ist, kann die Reaktion als beendet angesehen werden. Die Untersuchung der Lösung im Spektroskop zeigt nun, daß bei der beschriebenen Reaktion Phylloporphyrin in einen Farbstoff umgewandelt wird, dessen spektroskopische Eigenschaften denen des Hämins durchaus gleichen, nur sind die Bänder, wie zu erwarten war, mehr nach dem violetten Ende hin verschoben. Das

Hämin besitzt, in Chloroformlösungen, wie früher gezeigt wurde[1]), drei, nicht zwei Bänder, wie frühere Forscher angegeben hatten, deren Lagen durch die folgenden Wellenlängen charakterisiert sind:

Band I: λ 655—630
„ II: λ 555—534
Band „ : λ 524—497[2]).

Ein ganz analoges Spektrum zeigt auch das Phyllohämin. Zur Isolierung desselben verfuhr ich wie folgt. Die essigsaure, filtrierte Lösung wurde eingedampft und der trockene Rückstand mit anilinhaltigem Chloroform aufgenommen. Nach dem Filtrieren wurde mit mit Kochsalz gesättigtem Eisessig angesäuert und von neuem zur Trockene verdampft. Der jetzt erhaltene Rückstand wurde dann in essigsaurer Lösung, wie auch solcher in Chloroform, spektroskopisch untersucht.

Ich bin jetzt wieder in der Lage, mich ausschließlich wissenschaftlichen Studien zu widmen, und ich hoffe daher, die vielen von mir berührten Fragen der Chlorophyllchemie, besonders auch die auf Phylloporphyrin bezüglichen wieder in Angriff zu nehmen. Das analytische Studium des Phylloporphyrins und des Phyllohämins soll in erster Linie Berücksichtigung finden.

---

[1]) Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie **1904**, 227.

[2]) In konz. Lösungen bemerkt man noch ein viertes sehr schwaches Band auf der Na-Linie.

Bemerkungen zu der Arbeit von F. Sachs: „Farbenreaktionen der Pentosen“.

Von

Dr. Manfred Bial.

(Eingegangen am 7. Januar 1907.)

Unter obigem Titel veröffentlicht F. Sachs[1]) vergleichende Untersuchungen über die Leistungen einiger Pentose-Reaktionen. Im speziellen berichtet der Autor über mein Pentose-Reagens[2]), daß es mit normalem und glukuronsäurehaltigem Urin keinen Ausschlag, dagegen stets positiv Reaktion mit nativem Pentosurie-Urin zeige[3]). Trotz dieser Eigenschaften ist der Autor mit dem Pentose-Reagens nicht zufrieden, da es mit Harnen, denen künstliche l-Arabinose zugesetzt ist, erst dann Reaktion ergebe, wenn der Prozentgehalt 0,2 % beträgt. Das Reagenz sei also wenig scharf.

Zu dieser ungünstigen Beurteilung konnte F. Sachs nur dadurch kommen, daß er ein unzulässiges und unrichtiges Kriterium zur Prüfung des Pentose-Reagens heranzieht, nämlich den Gehalt an l-Arabinose[4]).

---

[1]) Biochemische Ztschr. **1**, H. 5—6.

[2]) Das Pentose-Reagens besteht aus 1 g Orcin, 500 ccm 30 % iger HCl und 20 gtt. liq. ferr. sesqu. (Deutsche mediz. Wochenschr. **1903**, Nr. 27). Zur Ausführung der Probe erhitzt man ca. 4 ccm Pentose-Reagens im Reagenz-Glas bis zum Sieden, entfernt das Glas von der Flamme und träufelt einige Tropfen Urin dazu. Bei Pentosurie erfolgt sofort oder nach ein paar Sekunden starke Grünfärbung. Das Reagens ist in dunkler Flasche aufzubewahren.

[3]) Der von Sachs bei Klönne & Müller, Berlin, Louisenstraße bezogene Probe-Urin ist der eines Pentosurikers aus meiner Beobachtung.

[4]) Dasselbe unrichtige Kriterium verwenden Geelmuyden (Ztschr. f. klin. Medizin **58**, 1906) und Jolles (Centralbl. f. inn. Medizin **1905**, Nr. 43) und machen deshalb Aussetzungen.

Ich habe meine Reagenz nicht zur Untersuchung auf l-Arabinose empfohlen, sondern zur Diagnose der Pentosurie. l-Arabinose aber und die Pentose des nativen Pentosurie-Urins verhalten sich bei mehreren Reaktionen ganz verschieden, wofür S. in seiner Mitteilung sogar neue Beweise bringt. Er zeigt ausdrücklich, daß nativer Pentosurie-Urin sich in bezug auf die Jollessche und Neumannsche Probe anders verhält als l-Arabinose und sogar die i-Arabinose, die C. Neuberg aus Pentosurie-Urin rein dargestellt hat. Daß mein Reagens auf l-Arabinose nicht besonders scharf reagiert, ist mir längst bekannt; auf das Verhalten zu l-Arabinose kommt es auch gar nicht an. Klinisch ist wichtig und zu fordern, daß es auf Pentosurie-Urin scharf reagiert. Das bestätigt mir ausdrücklich Sachs; und ich will hinzufügen, daß ich an Hunderten von Pentosurie-Urinproben von meinen 6 Pentosurie-Fällen[1]) stets positiven Befund mit meinem Reagens erhoben habe und aus der Literatur ersehe, daß andere Untersucher denselben guten Erfolg hatten[2]).

Einen besonders schlagenden Nachweis, wie scharf das Reagens ist, habe ich des öfteren schon erwähnt; ich gab mehrmals — auch in einer Mitteilung, von der Sachs Notiz genommen hat (Centr.-Bl. f. inn. Medicin **1906** Nr. 4) — an, daß mein Reagens noch scharfen Ausschlag gibt, wenn man frischen oder nicht zu alten, nativen Pentosurie-Urin mit normalem Harn auf das fünffache verdünnt. Bei solchen Urinen ist die alte Orcin-Reaktion oft unsicher, zum mindesten sehr schwach, die Fehlingsche Reaktion fällt nicht mehr positiv aus. Es ist also doch klar, daß Pentosurie-Urine, welche genügende Mengen Pentose enthalten, um mit Fehling zu reagieren und dadurch klinisch aufzufallen, mit meinem Reagens positiven Befund ergeben müssen[3]).

---

[1]) M. Bial, Ztschr. f. klin. Medizin **89**, 5 bis 6 und Berl. klin. Wochenschr. **1904**, Nr. 21.

[2]) Bendix, Münch. med. Wochenschr. **1903**. Tintemann, Ztschr. f. klin. Medizin **58**, 1906. E. Kraft, Pharmazeutische Ztschr. **1906**. F. Blum, Ztschr. f. klin. Medizin **59**, 1906.

[3]) Der native, von Sachs untersuchte Pentosurie-Urin reduziert übrigens bei jetziger Untersuchung so stark wie eine l-Arabinoselösung von 0,132 %. Ein anderer Pentosurie-Urin, der noch nicht so lange konserviert ist, reduziert wie eine 0,25 %ige l-Arabinoselösung; bei fünffacher Verdünnung dieses Urins mit normalem Urin fällt in der Mischung die Probe mit Pentose-Reagens noch scharf aus. Ich bin gern erbötig, Interessenten Proben dieses Pentose-Urins zugehen zu lassen.

Mehr ist vom Standpunkt des Klinikers nicht zu fordern.

Ich will hierbei nicht unterlassen, zu betonen, daß mein Reagens vor der alten Orcin-Reaktion nicht nur den formalen Vorzug der größeren Handlichkeit, sofortigen Gebrauchsfertigkeit und Einfachheit wegen des Fortfalls der spektroskopischen Untersuchung hat, sondern auch den materiellen der Eindeutigkeit. Mein Reagens reagiert bei der Harnuntersuchung absolut nur auf Pentose, nicht auf gepaarte Glukuronsäuren, während die Orcin-Reaktion, wenn die vorschriftsmäßige Kochzeit — $^1/_2$ Minute nach Blumenthal[1]) — eingehalten wird, auch positiv bei einer Reihe von im Harn beobachteten Glukuronsäuren ausfällt. Erhitzt man allerdings nur zum Sieden, wie Sachs angibt, dann reagieren gepaarte Glukuronsäuren selten mit der Orcin-Reaktion (gewisse wie Kresolglukuronsäure jedoch auch, wie Sachs selbst angibt), aber dann ist die Empfindlichkeit dieser Probe für Harne, die l-Arabinose enthalten, und nativen Pentosurie-Urin auch viel geringer (0,1 % l-Arabinose-Harn gibt keinen Ausschlag mehr, ebensowenig fünffach verdünnter Pentosurie-Urin). Allen diesen Unsicherheiten und vorsichtigen Erwägungen über die Kochzeit geht man am einfachsten aus dem Wege durch Verwendung von Pentose-Reagens, welches, wie Sachs auch bestätigt, nicht mit normalem Harn noch mit solchem, der gepaarte Glukuronsäuren enthält, reagiert, sondern nur mit Pentose, und damit am einfachsten zur Diagnose der Pentosurie führt.

---

[1]) Lehrbuch der Harnuntersuchungsmethoden. Berlin 1902.

Über das Vorkommen von Äthylalkohol und Äthylester im Tierkörper.

Von

Dr. Felix Reach.

(Aus dem physiologischen Institut der k. k. Hochschule für Bodenkultur in Wien.)

(Eingegangen am 7. Januar 1907.)

Die Frage, ob Alkohol im tierischen Organismus vorkomme, ist schon wiederholt Gegenstand von Untersuchungen gewesen. In jüngster Zeit hat sie dadurch an Aktualität gewonnen, daß sie mit der Glykolyse in Zusammenhang gebracht wurde. Umsomehr machte es sich unangenehm bemerkbar, daß bis vor kurzem eine gute Methode, Alkohol in kleinen Mengen mit Sicherheit nachzuweisen und zu bestimmen, fehlte. Die bisher erhaltenen Resultate sind denn auch recht widersprechend. Nicht einmal über die kleine Detailfrage, ob Alkohol bei der Fäulnis des Fleisches entstehe, herrschte Einigkeit.

Von einer historischen Übersicht kann hier wohl abgesehen werden, da Landsberg[1]), der vor kurzem Untersuchungen über diesen Gegenstand anstellte, die Literatur darüber zusammengestellt hat.

Landsberg selbst bediente sich des Verfahrens von Nicloux[2]), das in der Oxydation des Alkohols mit Chromsäure besteht. Die Reaktion, die dieser Bestimmung zugrunde liegt, kann nun auch von anderen organischen Substanzen herrühren. Landsberg hat

[1]) Ztschr. f. physiol. Chem. **41**.

[2]) Recherches expérimentales sur l'élimination de l'alcool dans l'organisme. Paris 1900.

es daher für nötig erachtet, den Alkohol dadurch zu identifizieren, daß er mit dem Oxydationsprodukte Aldehydreaktionen anstellte. So erscheint zwar der qualitative Nachweis des Alkohols gestützt, ob aber die verbrauchte Chromsäuremenge nur auf Alkohol zu beziehen sei, bleibt fraglich, sodaß eine neuerliche Prüfung des Gegenstandes mit einer anderen Methode nicht überflüssig sein dürfte.

Vor kurzem publizierte nun Stritar[1]) ein neues Verfahren für die Bestimmung kleiner Mengen von Äthylalkohol, welches wohl besondere Beachtung von seiten der Biochemiker verdient. Das Verfahren besteht in der Anwendung des Jodidverfahrens von Zeisel und Fanto[2]) (einer Modifikation der Zeiselschen Alkoxylbestimmung) auf den Äthylalkohol.

Das Prinzip der Methode besteht in Folgendem: Die alkoholhaltige Flüssigkeit wird destilliert, das Destillat wird mit Jodwasserstoffsäure gekocht, wobei sich Ätyljodid bildet. Dadurch, daß die jodidhaltigen Dämpfe durch eine Suspension von rotem Phosphor geleitet werden, wird die Jodwasserstoffsäure absorbiert und beim nachherigen Eintritt des Gases in eine alkoholische Silbernitratlösung wird das Jod des Äthyljodids an Silber gebunden. Die Ausfällung des Reaktionsproduktes wird erst durch Verdünnung der alkoholischen Silberlösung mit Wasser vollendet. Tangl[3]) hat das Jodidverfahren zur Bestimmung des Glyzerins im Blute herangezogen und es bei dieser Gelegenheit an einer auch den Physiologen gut zugänglichen Stelle ausführlich beschrieben.

Ich habe mich dieses Verfahrens zur Bestimmung von Äthylalkohol bei einer Reihe von Versuchen bedient, die ursprünglich von ganz anderen Gesichtspunkten aus unternommen wurden, als die sind, die sich im Verlauf der Untersuchung ergaben. Diese Versuche führten einerseits zu einer Nachprüfung der Angaben über das Vorkommen von Äthylalkohol im Tierkörper, andererseits förderten sie außerdem die Tatsache zutage, daß im tierischen Organismus Äthylalkohol in Form von Estern enthalten ist. Dieser letztere Befund, der mehrfache biologische Bedeutung besitzen könnte, mußte als etwas vollkommen Neues mit besonderer

---

[1]) Ztschr. f. physiol. Chem. **50**.
[2]) Ztschr. f. analyt. Chem. **42**.
[3]) Archiv f. d. gesamte Physiologie (Pflüger) **115**, 156 ff.

Vorsicht geprüft werden, und es war hier nötig, den Alkohol noch durch weitere Methoden zu identifizieren.

Ich teile zuerst jene Versuche mit, welche sich auf das Vorkommen von Äthylester beziehen, und komme dann auf den freien Alkohol zurück.

Ich untersuchte zunächst Leichenorgane eines Alkoholikers.

Versuch 1. 670 g Leber wurden mit der Fleischhackmaschine zerkleinert, durch mehr als 24 Stunden auf dem Wasserbade getrocknet und dann in einer Pulvermühle nochmals fein zerkleinert. Das so erhaltene Pulver wurde mit Petroleumäther extrahiert. Der Extrakt wurde nach dem Abdestillieren des Petroleumäthers noch mehr als 24 Stunden im Trockenschrank bei 100° gehalten. Er wog ungefähr 10 g. 9,9316 g davon wurden durch Kochen mit konzentrierter Kalilauge am Rückflußkühler verseift. Das Verseifungsgemisch wurde wiederholt destilliert, wobei das Destillat stets $^2/_5$—$^1/_2$ des Volumens der destillierten Flüssigkeit betrug. Unter dieser Bedingung gewinnt man, wie Stritar gezeigt hat, aus verdünnten Lösungen den ganzen Alkohol. Das letzte Destillat maß 6 ccm. 5 ccm hiervon wurden dem Jodidverfahren unterworfen und ergaben 0,0448 g JAg. Auf den ganzen Extrakt als Alkohol umgerechnet ergibt das 11,0 mg Alkohol oder 0,11 %.

Vers. 2. 80 g vom Mesenterium desselben Alkoholikers wurden in gleicher Weise extrahiert. 31,15 g des Extraktes wurden verseift; die Hälfte des letzten Destillats ergab nur 0,0048 g JAg; das entspricht etwas weniger als 1 mg Alkohol oder (auf den Extrakt bezogen) 0,006 %. Es muß jedoch bemerkt werden, daß sehr geringe Niederschlagsmengen beim Jodidverfahren auch dadurch entstehen können, daß nicht absorbierte Jodwasserstoffreste in die Silberlösung gelangen. Immerhin ist die gefundene Menge groß genug, um zu beweisen, daß das Mesenterium Spuren der fraglichen Substanz enthält. Andererseits ist die Menge des Jodsilbers bedeutend kleiner als im Versuch 1, in dem viel weniger Extrakt zur Verwendung kam.

Vers. 3. Aus dem Unterhautzellgewebe derselben Leiche erhaltene 6,0124 g Petroleumätherextrakt ergaben die minimale Menge von 0,0003 g JAg. Dieses Resultat kann nicht als positiv bezeichnet werden, da die gefundene Menge innerhalb der Fehlergrenze liegt.

Das Resultat dieser Untersuchung schien darauf hinzudeuten, daß der Alkoholiker in seiner Leber einen Teil des aufgenommenen Alkohols als Ester deponieren könne, während in den anderen untersuchten Geweben nur Spuren nachzuweisen waren. Es wurden Kontrolluntersuchungen an normalen Geweben vorgenommen, um zu sehen, wie die Verhältnisse beim Tiere liegen, das sicher keinen Alkohol zu sich genommen hat.

In den Versuchen 4, 5 und 6 wurde Pferdeleber in der gleichen Weise verarbeitet, wie früher Menschenleber. Bei Untersuchung von 20,32 g, 31,03 g und 12,49 g ergab sich ein Alkoholgehalt von 0,05 %, 0,02 % und 0,14 %. Man sieht also, daß auch normale Leber nach dem Kochen mit Kalilauge in wechselnder Menge eine Substanz enthält, welche mit Wasserdampf flüchtig ist und die Jodidreaktion gibt. Die untersuchte Säuferleber wird hinsichtlich des Gehaltes ihres Petroleumätherextraktes an der fraglichen Substanz sogar von einer der Pferdelebern übertroffen. Es ist immerhin möglich, daß eine fette Säuferleber im ganzen mehr davon enthält als normale Leber. Leider hatte ich bisher nur einmal Gelegenheit, Alkoholikerorgane in dieser Beziehung zu untersuchen.

Es wurde nun weiter geprüft, ob die alkoholabspaltende Substanz ein Begleiter des tierischen Fettes ist.

Im Versuch 7 wurden 165 g aus dem Mesenterium des Pferdes ausgeschmolzenen Fettes verseift und das Produkt nach wiederholter Destillation dem Jodidverfahren unterworfen. Die Silberlösung zeigte beim Verdünnen nur eine minimale Trübung, die nicht für einen positiven Ausfall in Anspruch genommen werden kann.

Vers. 8. 360 g Unterhautzellgewebe und Muskulatur vom Schweine wurden zerkleinert und ausgeschmolzen. 44,01 g des Fettes ergaben nur 0,0026 g JAg. Das entspräche 0,6 mg Alkohol oder 0,0008 %.

Vers. 9. Der Rückstand nach dem Ausschmelzen im Versuche 8 wurde mit viel Petroleumäther extrahiert. 25,48 g dieses Extraktes lieferten 0,0069 g JAg, entsprechend 1,4 mg oder 0,006 % Alkohol (auf den Extrakt bezogen).

Versuch 7 läßt also keinen Alkohol, Versuch 8 höchstens Spuren davon im Fette erkennen. Daß aus einem Gemenge von Muskeln und Fettgewebe beim Ausschmelzen im Versuch 8 viel

weniger Ester gewonnen wurde als beim darauffolgenden Extrahieren mit Petroleumäther im Versuch 9, deutet darauf, daß dieser Ester aus den Muskeln oder aus den Zellen des Gewebes stammt, nicht aber dem Fett angehört.

Es war der Verdacht nicht ganz abzuweisen, daß die flüchtige Substanz, welche die Jodidreaktion gab, aus dem Lezithin abgespalten war. Dieses enthält ja im Cholin eine Äthoxylgruppe. Freilich ist eine derartige Abspaltung aus Lezithin oder aus seinem Spaltungsprodukte Cholin bisher nicht beobachtet worden. Andererseits ergab sich, wie schon früher erwähnt, die Notwendigkeit, die Art der Substanz noch auf anderem Wege festzustellen.

In der Hoffnung, durch ein negatives Resultat in einem lezithinreichen Gewebe das Lezithin ausschließen zu können und gleichzeitig in der Frage nach der Verbreitung des gefundenen Körpers einen Schritt vorwärts zu machen, untersuchte ich Gehirn.

Vers. 10. 27,21 g Petrolätherextrakt aus Pferdehirn ergaben nach dem Verseifen und wiederholtem Destillieren im Jodidverfahren 0,2357 g JAg, was 48,3 mg oder 0,18 % Alkohol entspricht. Es enthält somit der Gehirnextrakt mehr von der Substanz als die Extrakte der untersuchten Lebern.

Ich griff nunmehr zum Fett des Eigelbs („Eieröl“).

Vers. 11. 16,84 g Eieröl ergaben 0,0602 g JAg (entsprechend 13,3 mg oder 0,07 % Alkohol).

Vers. 12. 12,53 g eines anderen Eieröls ergaben 0,0543 g JAg (entsprechend 10,3 mg oder 0,10 % Alkohol).

Es muß jedoch bemerkt werden, daß die erhaltenen Zahlen in Versuchen 11 und 12 etwas zu niedrig sind. In diesen beiden Versuchen wurde nämlich nur eine halbe Stunde mit Kalilauge gekocht, während die Verseifung bei allen anderen Versuchen mehrere Stunden lang fortgesetzt wurde. Ein Kontrollversuch mit demselben Eieröl wie in Versuch 12, jedoch bei 12stündigem Kochen, ist.

Vers. 13. 9,12 g Eieröl ergaben 0,0612 g JAg (entsprechend 12,6 mg oder 0,14 % Alkohol). Unser Ester ist mithin eine schwer spaltbare Substanz, bei der halbstündiges Kochen mit konzentrierter Kalilauge nicht genügt, um die Verseifung zu vollenden.

Um darüber, ob die jodbindende Substanz aus dem Lezithin abgespalten werde, ins klare zu kommen, untersuchte ich Lezithin selbst.

Vers. 14. 1,520 g Lezithin (von Merck bezogen) wurden in Wasser suspendiert und destilliert, bis das Destillat die Jodidreaktion nicht mehr gab, also der dem Präparate von der Darstellung her beigemengte Alkohol verjagt war. Dann wurde das Lezithin ebenso behandelt wie früher die Organextrakte. Nach Beendigung des Jodidverfahrens zeigte sich die Silberlösung vollkommen klar und gab beim Verdünnen nur eine minimale gelbliche Trübung durch Jodidsilber. Es konnte mithin ausgeschlossen werden, daß die fragliche Substanz dem Lezithin entstamme.

Um zu prüfen, ob der abdestillierte Körper wirklich Äthylalkohol sei oder nicht, mußte er in größerer Menge als bisher verfügbar sein. Als zugänglichstes Material zur Darstellung wurde wieder Eieröl gewählt, doch glaube ich berechtigt zu sein, das dabei gefundene Resultat auch auf die Organe auszudehnen, die beim beschriebenen Verfahren die Jodidreaktion gaben.

Vers. 15. 254 g Eieröl wurden in mehreren Portionen verseift und das Reaktionsgemisch destilliert. Die erste Destillation solcher Verseifungsgemische stößt infolge des starken Schäumens der Flüssigkeit auf einige Schwierigkeiten. Ich bin deshalb im Laufe der Untersuchungen dazu gelangt, das Verseifungsgemisch mit Oxalsäure anzusäuern. Bei dieser großen Menge Verseifungsgemisch im vorliegenden Falle hätte auch das nicht hingereicht, um einen glatten Verlauf der Destillation zu sichern. Es wurde deshalb mit soviel Oxalsäure versetzt, daß das Kalium größtenteils in das schwerlösliche Tetraoxalat übergeführt wurde. Die Flüssigkeit wurde auf der Nutsche abgesaugt und der Niederschlag noch einigemale gewaschen. Da aber dieses Waschen des voluminösen Niederschlags nicht bis zu seiner Erschöpfung fortgesetzt wurde, war die Ausbeute an Alkohol immerhin eine mäßige. Die Bestimmung in einem Teile der Flüssigkeit ergab als Gesamtmenge 0,2366 g Alkohol (0,093 %). Nachdem durch wiederholte Destillation das Volumen der Flüssigkeit verkleinert war, wurden folgende Reaktionen angestellt.

1. Ein kleiner Teil diente zur Liebenschen Jodoformreaktion. Der entstandene Niederschlag wurde mit Äther aufgenommen; beim Verdunsten des Äthers schieden sich charakteristische Jodoformkristalle ab.

2. Der Rest der Flüssigkeit wurde weiter wiederholt destilliert und stets $^{2}/_{5}$ bis $^{1}/_{2}$ des Volumens aufgefangen. Zu den letzten

dieser Destillationen diente ein Miniaturdestillationsapparat, der aus einem nur 10 ccm fassenden Fraktionierkölbchen bestand, über dessen Destillierrohr ein kleiner Kühler montiert war. Nachdem so die Flüssigkeit, die ursprünglich über 1 Liter betragen hatte, auf 2 ccm gebracht worden war, wurde mit frisch geglühtem, reinem Kaliumkarbonat gesättigt. Es schied sich über der gesättigten Salzlösung deutlich eine leicht gefärbte Schichte aus.

3. Endlich konnte noch gezeigt werden, daß das Jodid, das durch Einwirkung von Jodwasserstoffsäure entstand, ein primäres war. Ich ging hierbei ähnlich vor wie Tangl (der sich gleich mir der Ratschläge des Herrn Prof. Zeisel zu erfreuen hatte), als er bei der schon erwähnten Untersuchung ein sekundäres Jodid als solches sicherstellte.

Die Unterscheidung der primären, sekundären und tertiären Jodide (oder ähnlicher Kohlenwasserstoffabkömmlinge) kann nämlich, wie Victor Meyer[1]) gezeigt hat, auf das Verhalten gegen salpetrige Säure unter gewissen Bedingungen gegründet werden, wobei nur geringe Mengen Ausgangsmaterial nötig sind.

Die primären Jodide sind imstande, die einwertige NO_2-Gruppe und die zweiwertige NOH-Gruppe anzulagern. Sie bilden dabei Nitrolsäuren, deren Alkali-Salze sich durch ihre rote Farbe zu erkennen geben.

Bei ähnlicher Behandlung lagern die sekundären Körper die beiden einwertigen Gruppen NO_2 und NO an und bilden die charakteristischen, blaugefärbten Pseudonitrole. Bei den tertiären Verbindungen, wo nur eine Valenz zur Verfügung ist, bleibt die Reaktion bei der Bildung der einfachen Nitrokörper stehen.

In unserem Falle gestaltete sich das Verfahren folgendermaßen: Die bei der vorigen Prozedur (2) erhaltene Flüssigkeit wurde nochmals destilliert. Hierauf geradeso wie beim Jodidverfahren und im gleichen Apparate mit heißem Jodwasserstoff gekocht und die Dämpfe durch die Phosphorsuspension geleitet. Schließlich aber statt in alkoholischer Silberlösung in 5 ccm Äther aufgefangen. Dieser Äther wurde mit Silbernitrit im Überschuß versetzt und nach $^1/_2$ Stunde filtriert. Das Filtrat mit schwacher Kalilauge geschüttelt und mit etwas Kaliumnitrit versetzt, gab eine Rotfärbung der wässerigen Flüssigkeit, die beim Ansäuern ver-

[1]) Annalen d. Chem. **175**, 88 ff. 1875.

schwand. Das durch Behandeln mit JH gebildete Jodid war mithin ein primäres.

Aus dem allen geht hervor, daß aus dem Petroleumätherextrakt von Organen durch Kochen mit Kalilauge ein Körper erhalten wird, der mit Wasserdampf flüchtig ist, die Jodoformreaktion und die Jodidreaktion gibt, bei letzterer ein primäres Jodid bildet und der sich aus Wasser durch Sättigung mit Kaliumkarbonat als Flüssigkeit abscheiden läßt. Dieser Körper kann nur Äthylalkohol sein. Da er erst durch Spalten mit Kalilauge frei wird, so darf man wohl schließen, daß im Tierkörper Äthylester vorkommen.

Um über das Wo und Wann des Auftretens dieser Ester Näheres aussagen zu können, wird es noch weiterer Untersuchungen bedürfen. Es dürfte jedoch die Tatsache allein, daß der Alkohol in dieser Form vorkommt, wichtig genug sein, um ihre Mitteilung zu rechtfertigen.

Der Befund eröffnet einen Ausblick auf eine Reihe neuer Fragestellungen, von denen einige hier gestreift werden sollen. Landsberg fand nach Zuckerdarreichung den Alkohol in den Organen nicht vermehrt; es wird nunmehr nötig sein, derartige Untersuchungen mit Rücksichtnahme auf den veresterten Alkohol zu wiederholen. Meine Untersuchungen über diesen Gegenstand sind noch zu keinem Abschluß gelangt. Auch für die Frage über die Abhängigkeit der Äthylester im Tierkörper vom Alkoholgenuß gestatten meine Versuche vorläufig noch keinen Schluß. Ebenso wenig läßt sich derzeit über den Paarling des Äthylalkohols und über den Zusammenhang zwischen dem freien und dem gebundenen Alkohol aussagen. Es läßt sich die Möglichkeit nicht ganz von der Hand weisen, daß bereits beim Destillieren ein Teil des veresterten Alkohols abgespalten wird und dadurch der Befund des freien zustande kommt.

Was meine eigenen Erfahrungen über diesen letzteren Umstand, das Vorkommen von freiem Alkohol im tierischen Organismus anbelangt, so kann ich mich diesbezüglich kurz fassen, da meine Resultate im wesentlichen eine Bestätigung der Befunde Landsbergs sind.

Freier Alkohol kommt im Tierkörper in wechselnder Menge vor. Die untere Grenze scheint 0 zu sein. Als Maximum für Muskulatur erhielt ich bei Untersuchung von 350 g frischem Kaninchen-

fleisch 0,0017 %. Landsberg schätzt die Menge in einem seiner Fälle wesentlich höher (ungefähr 0,009 %). Bei nicht frischem Fleisch ist der Alkoholgehalt bedeutend größer. 360 g 3 Tage alten Schweinefleisches enthalten 0,0592 g Alkohol (0,016 %).

Bemerkenswert ist, daß das Gehirn, in dem wir schon relativ hohe Werte von Äthylester gefunden haben, auch mehr freien Alkohol enthält als die Muskulatur. Bei Untersuchung von etwas weniger als 1/2 Kilogramm Rindshirn zeigte sich einmal ein Alkoholgehalt von ungefähr 0,003 %, ein zweites Mal nur etwa 0,001 % (bezogen auf frische, feuchte Substanz).

Das hauptsächlichste Ergebnis der hier niedergelegten Untersuchungen besteht demnach in der Konstatierung, daß der Tierkörper neben geringen Mengen freien Alkohols auch geringe Mengen Äthylester enthält.

Schließlich sage ich Herrn Professor Durig, in dessen Laboratorium und mit dessen Unterstützung die Arbeit ausgeführt wurde, meinen besten Dank. Ferner fühle ich mich Herrn Prof. Zeisel, der mich wiederholt durch seinen schätzenswerten Ratschläge förderte, zu großem Danke verpflichtet.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

VIII. Mitteilung.

Über die physikalisch-chemischen Bindungsverhältnisse verschiedener Stoffe im Blute.

Von

R. Rosenfeld.

(Eingegangen am 28. Dezember 1906.)

Die Frage, ob die im Blute vorkommenden kristalloiden Stoffe frei gelöst oder irgendwie gebunden seien, ist für die Lehre von der Sekretion und der Transsudation von großer Bedeutung. Streng genommen ist diese Frage von Wichtigkeit bei der Erörterung des stofflichen Austausches einer jeden beliebigen Körperzelle und der sie umgebenden Flüssigkeit. Denn es ist klar, daß zur Auslese einer im Blute vorhandenen, irgendwie gebundenen Substanz durch dieselben die Prozesse nicht hinreichen, welche für die frei gelösten Substanzen genügen. Entweder müssen von der Zelle ausgehende Kräfte im ersteren Falle die Bindung lösen oder es müssen durch stoffliche Produkte der Zelle, die im gegebenen Momente bereit stehen, die Bindungsverhältnisse geändert werden.

Die hier erörterte Frage ist über das Stadium der rein theoretischen Diskussion längst hinaus. Denn für eine besonders wichtige Stoffgruppe, die Alkalien des Blutes, haben Zuntz und Loewy[1]) und Gürber[2]) den Nachweis geliefert, daß nur ein Teil derselben frei gelöst sei, ein anderer aber gebunden. Der Nachweis wurde

---

[1]) Zuntz und Loewy, Pflügers Arch. 1894, 428.

[2]) Gürber, Sitzungsber. d. med. physik. Gesellsch. zu Würzburg, 25. Februar 1895.

mit Hilfe der Diffusion geliefert. Auf diese Versuche wird später einzugehen sein. Rein physikalisch chemische Versuche wurden nach den genannten Autoren mit Rücksicht auf die Bindungsverhältnisse der Stoffe im Blute lange Zeit nicht mehr angestellt. Hingegen wurden sehr vielfach aus der Art und Weise, wie bestimmte im Blute vorkommende Stoffe in den Sekreten, namentlich im Harn ausgeschieden werden, Rückschlüsse auf deren Bindungsverhältnisse gezogen. So wertvoll diese Erwägungen auch sein mögen, die Beweiskraft des physikalisch-chemischen Versuches kommt ihnen nicht zu.

Im Jahre 1902 veröffentlichte Buffa[1]) eine Untersuchungsreihe, deren Ergebnisse ihn zu dem Schlusse führten, daß das Serum keine Lösung sei, sondern eine einheitliche Flüssigkeit von besonderer molekularer Zusammensetzung. Die wesentlichsten seiner Versuchsergebnisse sind die folgenden: Serum wird partiell gefroren und dadurch eine gefrorene, zur Untersuchung wieder aufgetaute Portion und eine flüssig gebliebene Portion gewonnen. Von diesen beiden Portionen, sowie von dem ursprünglichen Serum bestimmte Buffa die Dichte, die Oberflächenspannung, den Gefrierpunkt, den Trockenrückstand und die Asche. So ergab sich, daß annähernd die Dichten der ursprünglichen und der gefrorenen Portion gleich waren. Die Gefrierpunktserniedrigung des gefrorenen, wieder aufgetauten Teiles war geringer als die des ursprünglichen, diejenige des gelöst gebliebenen Teiles war größer, aber die Unterschiede entsprachen nicht dem, was bei einer Lösung zu erwarten war. Einem Minimum der Dichte entsprach ein Minimum der Oberflächenspannung, einem Maximum der Dichte entsprach ein Maximum der Oberflächenspannung; wäre das Serum eine Lösung, so hätten die Beziehungen gerade die umgekehrten sein müssen.

Da Professor Asher im Verfolg seiner Studien über die Physiologie der Drüsen mich veranlaßte, unter seiner Beihilfe einige Untersuchungen über die physiologisch chemischen Bindungsverhältnisse der Stoffe im Blute anzustellen, erschien es angebracht, die von Buffa vorgebrachten Tatsachen mit in den Bereich der Untersuchungen zu ziehen. Die von ihm vertretenen Anschauungen stehen durchaus im Widerspruch mit fast allen bisher gewonnenen Erfahrungen und auch meine eigenen auf anderem Wege erhaltenen

[1]) Buffa, Le sérum de sang et ses rapports avec le système glandulaire. Arch. ital. de Biol. 38, 273. 1902.

Beobachtungen stehen damit nicht im Einklang. Vielmehr sprechen sie dafür, daß bestimmte, für die Sekretionslehre sehr wichtige Stoffe frei gelöst sind. Es war daher zu untersuchen, ob Buffas Resultate tatsächlich zu Recht bestehen und ferner, falls dies der Fall ist, ob die Methoden, durch deren Hilfe die betreffenden Resultate erhalten wurden, gestatten die oben erwähnten Schlußfolgerungen zu ziehen.

I. Nachprüfung der von Buffa mitgeteilten Tatsachen.

Die Methode, deren sich Buffa bediente, um zu prüfen, ob das Serum eine Lösung sei oder nicht, war die, daß er das Serum teilweise ausfror und dann den gefrorenen wieder aufgetauten Teil und den nicht gefrorenen Teil für sich untersuchte. Bei nicht zu konzentrierten Lösungen friert reines Wasser aus, während die gelöste Substanz in der Lösung zurückbleibt. Das Ausfrieren von Wasser repräsentiert eine Arbeitsleistung an der Lösung gegen den osmotischen Druck, den die gelösten Bestandteile ausüben. Diese Arbeit tut sich kund in der Gefrierpunktserniedrigung der Lösung gegenüber derjenigen von reinem Wasser. Die Gefrierpunktserniedrigung, in analoger Weise die Siedepunktserhöhung und die Erniedrigung des Dampfdruckes sind umgekehrt für uns ausschlaggebende Kriterien für die Natur einer zu untersuchenden Lösung. Denn je mehr frei gelöste Moleküle, beziehentlich Moleküle und Jonen in der Flüssigkeit vorhanden sind, um so größer ist der Widerstand, den sie einer Entfernung von Wasser entgegensetzen, um so größer also die Gefrierpunktserniedrigung, die Siedepunktserhöhung und die Dampfdruckverminderung. Die beim Ausfrieren verdünnter Lösungen (bei konzentrierten Lösungen treten verwickelte Verhältnisse ein) erhaltenen zwei Portionen müssen demnach sehr verschiedene Werte der genannten physikalischen Konstanten geben, auch, wenn Elektrolyte gelöst sind, sehr verschiedene Werte der Leitfähigkeit, indem der gefrorene Teil die dem reinen Wasser zugehörigen Werte annähernd zeigen muß; das gleiche gilt auch hinsichtlich der Dichte. Die Analyse einzelner gelöster Bestandteile würde im gefrorenen Anteil sehr wenig, im flüssig gebliebenen mehr ergeben, wegen der Konzentrierung, als in der ursprünglichen Flüssigkeit.

Die Ausfrierung habe ich auf folgende Weise ausgeführt. Ein großes mit einer Mischung von Eis und Kochsalz beschicktes Kühl-

gefäß wurde auf etwa -5 bis -6$_0$, höchstens -8$_0$ gehalten. Das zur Ausfrierung bestimmte Serum wurde in ein Becherglas gebracht, das Becherglas in ein zweites eingesetzt, welches als Luftmantel diente. Ein durchlochtes Becherglas bedeckte das innere Gefäß; durch das Loch führte ich einen Rührer ein. Im Kältebad wurde der Rührer möglichst gleichmäßig in Bewegung gesetzt. Sobald ein zur Analyse hinreichender Teil ausgefroren war, wurde der Gefrierprozeß unterbrochen. Rasch wurde der nicht gefrorene Anteil vom gefrorenen durch ein Gasefilter abfiltriert. Behufs Reinigung des gefrorenen Anteils habe ich eine besondere Portion der Serumflüssigkeit partiell für sich ausgefroren, den ausgefrorenen Teil wieder aufgetaut und als Waschflüssigkeit des zu untersuchenden Eises benutzt.

Im Stammserum, im gefrorenen und im nicht gefrorenen Teil habe ich mit Hilfe des Beckmannschen Apparates die Gefrierpunktserniedrigung bestimmt. Jede Bestimmung geschah doppelt. Das Kühlbad wurde konstant auf -8$_0$ gehalten, die benutzte Flüssigkeitsmenge war stets die gleiche, die Rührung eine gleichmäßige. Das spezifische Gewicht habe ich mit Hilfe des Gewichtspyknometers ermittelt, nach Volhards Methode den Kochsalzgehalt analysiert. Die Leitfähigkeitsbestimmung geschah nach der Kohlrauschschen Methode, mit Telephon und Ostwaldschem Meßdraht; als Elektrodengefäß diente das von Asher konstruierte für kleine Flüssigkeitsmengen. Zur Bestimmung von Eiweiß habe ich die Serumportionen mit dem zehnfachen Volumen 95 %igen Alkohols gefällt, durch aschefreies Filter abfiltriert, getrocknet und das Filter mit Niederschlag gewogen; vom Gewicht wurde dann nach Veraschung das Gewicht der Asche abgezogen.

Ich teile zunächst drei an Pferdeserum angestellte Versuche mit, deren Ergebnisse untereinander und mit anderen, die ich außerdem angestellt habe, identisch sind.

Versuch 1.

	Gefrierpunkt	Spez. Gewicht	Proz. ClNa-Gehalt	Leitfähigkeit
Stammserum . .	— 0,605	1,0221	0,56	118×10^{-2}
Der gefrorene Teil	— 0,540	1,0206	0,52	105×10^{-2}
Der nicht gefrorene Teil . .	— 0,695	1,0231	0,50	116×10^{-2}

Versuch 2.

	Gefrierpunkt	Spez. Gewicht	Proz. Cl Na-Gehalt	Leitfähigkeit	Eiweiß-Gehalt
Stammserum . .	— 0,615	1,0237	0,57	99×10^{-3}	5,913
Der gefrorene Teil	— 0,650	1,0232	0,56	103×10^{-2}	5,943
Der nicht gefrorene Teil . .	— 0,69	1,0260	0,65	113×10^{-2}	6,427

Versuch 3.

	Gefrierpunkt	Spez. Gewicht	Proz. Cl Na-Gehalt	Leitfähigkeit	Eiweiß-Gehalt
Stammserum . .	— 0,650	1,0240	0,56	113×10^{-3}	5,959
Der gefrorene Teil	— 0,548	1,0206	0,46	100×10^{-3}	5,674
Der nicht gefrorene Teil . .	— 0,71	1,0268	0,68	117×10^{-3}	5,980

Versuch 4.

	Gefrierpunkt	Spez. Gewicht	Proz. ClNa-Gehalt
Stammserum . . .	— 0,625	1,0233	0,538
Der gefrorene Teil .	— 0,600	1,0218	0,460
Der nicht gefrorene Teil	— 0,738	1,0251	0,66

Versuch 4a. Kalbserum.

	Spez. Gewicht	Proz. ClNa-Gehalt	Eiweiß
Stammserum . . .	1,0238	0,55	6,108
Der gefrorene Teil .	1,0186	0,54	4,676
Der nicht gefrorene Teil	1,0191	0,66	7,291

Im allgemeinen zeigt sich, ganz wie Buffa angibt, daß die Unterschiede zwischen den drei Portionen keine sehr großen sind. Der gefrorene und wieder aufgetaute Teil weist alle Characteristica des Serums auf, ja es ist sogar nicht in jedem Falle dieser Teil wenigstens soweit durch das Ausfrieren gereinigt, daß er geringere molekulare und Jonenkonzentration aufweist. Der Eiweiß-

gehalt der drei Portionen ist bemerkenswerterweise gleichfalls kaum von einander unterschieden. Gestützt auf diese Tatsachen, könnte man geneigt sein, der Anschauung beizupflichten, daß das Serum gar keine Lösung sei, da sich beim Ausfrieren keine Trennung von Lösungsmitteln und Gelöstem bewerkstelligen ließe. Aber dies wäre nur zulässig, wenn die Methode, deren man sich bei diesen Versuchen bedient, nicht Fehler enthält, welche zu unrichtigen Ergebnissen führt. Da man mit anderen Methoden die Tatsache des frei Gelöstseins bestimmter Blutbestandteile sicher nachweisen kann, muß das entgegengesetzte Resultat an den Fehlern liegen, welche das Ausfrieren im Gefolge hat. Zunächst läßt sich zeigen, daß auch andere Lösungen, welche aus kolloiden und kristalloiden Bestandteilen bestehen, beim partiellen Ausfrieren sich ebenso verhalten, wie Serum, beispielsweise Hühnereiweiß. Ich gebe hierfür zwei Belege.

Versuch 5. Hühnereiweiß.

	Gefrierpunkt	Spez. Gewicht
Stammeiweiß	— 0,53	1,0418
Der gefrorene Teil . . .	— 0,612	1,0412
Der nicht gefrorene Teil .	— 0,750	1,0407

Versuch 6. Hühnereiweiß.

	Gefrierpunkt	Spez. Gewicht
Stammeiweiß	— 0,552	1,0413
Der gefrorene Teil . . .	— 0,590	1,0433
Der nicht gefrorene Teil .	— 0,620	1,0433

Man hätte nun daran denken können, daß die Eigentümlichkeiten von Serum und Hühnereiweiß beim partiellen Frieren an ihrem relativ hohen Eiweißgehalt liege. Ich habe aber genau die gleichen Erscheinungen bei verdünnten Eiweißlösungen gesehen. Auch bei Stärkelösungen und Gummilösungen konnte ich genau die gleichen Erscheinungen beobachten. Aber nicht allein an kolloiden Lösungen, sondern auch an ganz einfachen Lösungen kristalloider Körper zeigt sich bei Anwendung des Buffaschen Verfahrens die Tatsache, daß der gefrorene Teil noch eine sehr hohe molekulare Konzentration aufweist.

Versuch 7. Kochsalzlösung.

	Gefrierpunkt
Stammlösung	— 0,550
Der gefrorene Teil . . .	— 0,495
Der nicht gefrorene Teil .	— 0,615

Wenn auch der möglichst sorgsam behandelte gefrorene und wieder aufgetaute Teil eine geringere Gefrierpunktserniedrigung aufweist als die ursprüngliche Lösung, so steht er doch dieser viel näher als dem reinen Wasser. Aus allem diesen geht hervor, daß die partielle Ausfrierung und die Analyse der einzelnen bei partieller Ausfrierung erhaltenen Teile keine Auskunft geben kann, ob eine echte Lösung vorliegt, welche aus einzelnen gelösten Molekülen und Wasser besteht. Es fragt sich, welches die Erklärung sei, daß beim Ausfrieren einer größeren Eismenge aus einer verdünnten Lösung der Eisblock nicht reines Wasser sei, sondern mehr oder weniger die Zusammensetzung der ursprünglichen Flüssigkeit hat. Die Erklärung hierfür ist darin zu suchen, daß, wie die grundlegenden Untersuchungen von G. Quincke[1]) gelehrt haben, beim Abkühlen des Wassers Eiskristalle und ölartige Mutterlauge in kurzen Zwischenräumen oder periodisch sich abscheiden. Eis von 0° ist nach Quincke eine flüssige Gallerte. Diese Gallerte schließt nun je nach der ursprünglichen Zusammensetzung der Flüssigkeit mehr oder weniger von dieser Flüssigkeit ein, besonders wird dieser Einschluß begünstigt werden, wenn die Flüssigkeit, wie es beim Serum der Fall ist, kolloide Substanz enthält.

Zu den gleichen Ergebnissen hinsichtlich der Anschauungen von Buffa gelangen mit Hilfe von zum Teil ähnlichen Methoden Rossi[2]) und Foà[3]). Rossi insbesondere veröffentlichte eine sinnreiche Methode, vermittels deren es ihm tatsächlich gelang, die

---

[1]) G. Quinke, Eis, Eisen und Eiweiß, Verhandl. der Naturhist. Mediz. Vereins zu Heidelberg Nr. 58, **1906**, 355, sowie zahlreiche Abhandlungen in Drudes Annalen.

[2]) Rossi, Di un metodo per condensere i colloidi nelle lore soluzione, Archiv di Fisiologia **2**, 638. 1905. Rossi, Sul congelamente e sulla fusione del siero di sangue et di altre soluzione colloidale e salina, Archiv di fisiol. **3**, 168. 1905.

[3]) Foà, Sulle condizione dellacqua nel siero di sangue. Ibidem S. 171.

kolloiden Bestandteile des Serum für sich allein aus ihrer Lösung herauszukondensieren. Es möge noch, um jedem Zweifel vorzubeugen, hervorgehoben werden, daß dasjenige, was bei allen hier besprochenen Lösungen wirklich ausfriert, reines Wasser ist. An den gesicherten Lehren des osmotischen Druckes von Lösungen wird durch den Umstand, daß die zu Analysenzwecken ausgeschiedene Eismenge ein mechanisches Konglomerat vorstellt, nichts geändert.

II. Prüfung der Bindungsverhältnisse mit Hilfe der Diffusion.

Zu richtigeren Aufschlüssen über die wahre Zusammensetzung des Serums führen andere Methoden, zu denen in erster Linie die Diffusion gehört. Daß wir es im Blute mit einer echten Lösung zu tun haben, geht ja zur Evidenz daraus hervor, daß das Blut sowohl einen hohen osmotischen Druck wie auch merkliche elektrische Leitfähigkeit besitzt. Aber mit diesen Tatsachen ist andererseits nicht ausgeschlossen, daß einzelne Bestandteile keinen Anteil hieran haben, sondern mehr oder weniger fest gebunden seien. Um so mehr ist man berechtigt, dieser Frage nachzugehen, als, wie oben erwähnt wurde, Zuntz sowohl wie Gürber nachgewiesen haben, daß nur ein Teil des Alkalis im Blute frei gelöst sei, ein anderer aber gebunden. Dieser Nachweis glückte mit Hilfe der Diffusion. Die beiden Forscher zeigten, daß langandauernde Diffusion von Blut oder Serum gegen Wasser nur einen Teil des durch Titration ermittelbaren Alkalis entfernte. Der Grund dieser Nichtentfernbarkeit liegt darin, daß dieser betreffende Teil an Körper gebunden ist, welche nicht durch Pergamentmembran diffusibel sind oder, was dem zufolge dasselbe besagt, welche an kolloide Körper gebunden sind. Nicht allein diese kolloide Bindung wurde von den genannten Forschern entdeckt, sondern zugleich auch das Mittel, welches im Stoffwechsel bereit gestellt wird und wodurch den jeweiligen Bedürfnissen des Organismus genügt wird. Sie fanden, daß CO_2 das gebundene Alkali in die freie, d. h. diffusionsfähige Form überzuführen vermag.

Das, was für das Alkali des Blutserums unzweifelhaft nachgewiesen worden ist, wurde seitdem für eine Reihe von anderen Aschebestandteilen des Blutes angenommen. In sehr umfassender Weise ist in der allgemeinen Physiologie der Nerven und Muskeln bekanntlich der Begriff der kolloiden Bindung bestimmter Asche-

bestandteile, insbesondere der Jonenproteide, von Loeb und seiner Schule eingebürgert worden. Mit der wichtigen Frage, inwieweit bei den Lebenserscheinungen der Eintritt von Molekülen oder Jonen in den Verband der Proteide der Zelle eine Rolle spielt, habe ich mich hier nicht zu beschäftigen. Die Aufgabe zu untersuchen, inwiefern einzelne Aschebestandteile des Blutes frei gelöst oder kolloid gebunden sind, ist ganz unabhängig von den soeben berührten Problemen. Hingegen ist sie nicht unwichtig mit Rücksicht auf gewisse streitige Probleme der Sekretionslehre. Während man früher kaum darüber Zweifel hegte, daß kristalloide Körper wie z. B. das Kochsalz im Blute frei gelöst vorkommen, begann allmählich angesichts gewisser Schwierigkeiten, die bei der Ausscheidung von Kochsalz durch die Niere zutage treten, die Ansicht diskutiert zu werden, daß das Kochsalz kolloid gebunden im Blute vorkomme. Zwar sollte dieses Verhalten des Kochsalzes nicht die Regel sein, sondern nur in gewissen Fällen, vornehmlich in Kochsalzhunger. Forster war wohl der erste, der die Nichtausscheidung des Kochsalzes durch die Niere im Hunger erklärte durch die Annahme, daß im Hunger eine andere Bindung des Kochsalzes vorliege als sonst. Seitdem sind ihm hierin alle Autoren gefolgt, welche einerseits das Kochsalz durch die Niere vermittels einfacher Filtration zur Ausscheidung gelangend annehmen und andererseits sich angesichts der Schwierigkeit sahen, daß der prozentische Kochsalzgehalt des Blutes jederzeit sich gleich blieb.

In bezug auf die Phosphate liegen die Verhältnisse ähnlich. Da injizierte Phosphate scheinbar durch die Niere anders ausgeschieden werden als die im Blute an und für sich vorkommenden — eine Behauptung, welche vor der experimentellen Kritik nicht standgehalten hat — wurde gleichfalls angenommen, daß die Phosphate des Blutes kolloid gebunden seien im Gegensatz zu den frei gelösten bei der intravenösen Injektion. Als dritter vornehmlich mit in Betracht kommender Körper wäre der Zucker zu nennen. Hier liegen die Dinge viel komplizierter als beim Kochsalz und bei den Phosphaten, da außer gewissen Annahmen, die zur Erklärung bestimmter Ausscheidungsverhältnisse gemacht werden, hinzukommen gewisse Schwierigkeiten bei der chemischen Analyse des Blutzuckers.

A. Bindungsverhältnisse des Kochsalzes im Blute geprüft durch Diffusion.

Die Prüfung, ob das Kochsalz im Blute frei gelöst oder kolloid, beziehentlich teilweise kolloid gebunden sei, geschah mit Hilfe der Diffusion. Als Diffusionsschläuche benutzte ich, wenn größere Mengen zur Verfügung standen, die langen Dialysierschläuche von Kühne, welche die Firma Desoga in Heidelberg liefert. Die Dialyse geschah entweder gegen fließendes Leitungswasser oder gegen mehrfach gewechseltes destilliertes Wasser oder schließlich gegen Blut, das einer besonderen, in den Versuchsprotokollen näher beschriebenen Vorbereitung unterworfen worden war. Bei kleinen Mengen benutzte ich die neuen von der Firma Schleicher und Schüll in den Handel gebrachten Dialysierhülsen. Dieselben lassen sich durch Korkverschluß gegen Verdunstung ihres Inhalts schützen. Jeder Dialysator wurde vor dem Gebrauch auf seine Dichtigkeit durch Blut geprüft.

Versuch 8.

	Menge in ccm vor der Dialyse	Menge in ccm nach der Dialyse	Proz. ClNa-Gehalt vor der Dialyse	Proz. ClNa-Gehalt nach der Dialyse
Serum gegen destilliertes Wasser 24 Stunden	50	62	0,56	0
Serum gegen Kochsalzlösung 0,56 % 24 Stunden . . .	50	52	0,56	0,52
Kochsalzlösung gegen destilliertes Wasser 24 Stunden	50	43	0,56	0

Versuch 9.

	Menge in ccm vor der Dialyse	Menge in ccm nach der Dialyse	Proz. ClNa-Gehalt vor der Dialyse	Proz. ClNa-Gehalt nach der Dialyse
Serum gegen destilliertes Wasser 24 Stunden	50	67	—	0,03
	50	72	—	0,01
	—	—	—	0,02

Diese beiden Versuche zeigen zunächst, daß geeignete Diffusion gegen destilliertes Wasser, wie bekannt innerhalb 24 Stunden, das Kochsalz des Serums ganz oder bis auf Spuren entfernt. Außer-

dem habe ich im Versuch 8 Serum gegen Kochsalzlösung von derselben Konzentration wie das Serum diffundiert. Wäre ein Teil des im Serum vorhandenen Kochsalzes kolloid gebunden und nur ein Teil frei gelöst, so würde der osmotische Druck des Kochsalzes im Serum geringer gewesen sein als in der Kochsalzlösung und demzufolge hätte sich Kochsalz aus der Lösung in das Serum begeben müssen bis zum Druckausgleich. Wie man sieht, ist keine Vermehrung des prozentischen Kochsalzgehaltes im Serum eingetreten, vielmehr hat sich Serum und Kochsalzlösung als osmotisch gleichwertig erwiesen.

Es könnte daran gedacht werden, daß die feineren Bindungsverhältnisse des Kochsalzes im Blut nicht zutage treten durch die langandauernde Diffusion, daß vielmehr im Verlauf derselben allmählich immer mehr von dem gebundenen Kochsalz frei und somit diffusionsfähig wird. Aus diesem Grunde hatte ich eine Reihe von Versuchen angestellt, in denen die Diffusion sehr viel kürzere Zeit andauerte. Auch nach einer anderen Richtung hin erschien es angebracht, die Versuchsbedingungen zu variieren, indem nämlich das Serum gegen Blut diffundiert wurde, das selbst längere Zeit einer langandauernden Diffusion ausgesetzt worden war.

Ehe ich zur Mitteilung der Ergebnisse übergehe, möchte ich erwähnen, daß im Blute behufs gründlicher Veraschung diese in großen Nickelschalen ausgeführt wurde. Beim Eindampfen des zu untersuchenden Blutes wurde Kalihydrat puriss. pro analys. in Substanz zugefügt, nach dem Eindampfen gelinde verkohlt und darauf Kalisalpeter in Pulverform aufgestreut. Die Veraschung verläuft dann glatt und gründlich. Kontrollanalysen mit genau abgewogenen Kochsalzmengen lieferten quantitativ genaue Resultate. Des besseren Vergleichs wegen wurden alle weiteren hier mitgeteilten Analysen auf die gleiche Weise angestellt. (Vergl. die Tabellen Versuch 10 bis 13.)

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß auch bei einer kürzer dauernden Dialyse von Serum gegen destilliertes Wasser das Serum sich genau so verhält wie eine Kochsalzlösung. Der stärkste Abfall findet im Serum, genau entsprechend den Diffusionsregeln an einfachen Lösungen, in den ersten Stunden statt, weil das Konzentrationsgefälle dann am größten ist. Durch häufigen Wechsel des destillierten Wassers (wie es z. B. in dem Dialysator von Gürber

Versuch 10.

$2^1/_2$ Liter Ochsenblut unter Zusatz von 5 g Fluornatrium in 100 ccm Wasser.

	Menge in ccm vor der Diffusion	Menge in ccm nach der Diffusion	Proz. ClNa-Gehalt vor der Diffusion	Proz. ClNa-Gehalt nach der Diffusion	Bemerkungen
Serum gegen destilliertes Wasser 2 Stunden . .	50	49	0,57	0,195	Serum wurde durch Zentrifugieren gewonnen.
Salzlösung gegen destilliertes Wasser 2 Stunden .	50	49	0,56	0,23	
Stammblut 24 Stund. gegen fließendes Wasser . .	—	—	—	0,24	
Serum gegen das diffundierte Blut	50	43	0,57	0,41	

Versuch 11.

2 Liter Rindsblut aufgefangen in einen Kolben, der 5 g Fluornatrium enthält.

	Menge in ccm vor der Diffusion	Menge in ccm nach der Diffusion	Proz. ClNa-Gehalt vor der Diffusion	Proz. ClNa-Gehalt nach der Diffusion	Bemerkungen
Serum gegen destilliertes Wasser 4 Stunden . .	50	50	0,61	0,14	Serum durch Zentrifugieren gewonnen.
Salzlösung gegen destilliertes Wasser 4 Stunden .	50	49	0,56	0,02	
Blut gegen fließendes Wasser 2 × 24 Stunden	—	—	—	0,29	
Serum gegen das diffundierte Blut 4 Stunden .	50	43	0,61	0,45	

möglich ist) gelingt es innerhalb 7 Stunden das Serum fast kochsalzfrei zu machen.

Um Serum zu diffundieren gegen eine Lösung, welche kolloide Substanzen enthält, womit einigermaßen die Verhältnisse im Organismus nachgeahmt werden, habe ich Rinderblut benutzt. Dies Rinderblut wurde einer 24 stündigen Dialyse gegen fließendes Wasser unterworfen, manchmal eine noch längere Zeit. Rinderblut läßt sich auf diese Weise nicht chlorfrei machen, die erhaltenen Endwerte für Chlor als Chlornatrium berechnet, schwanken zwischen 0,29 bis 0,11 %. Die Analyse des Serums eines längere

Versuch 12.

$2\,^1/_2$ Liter Rindsblut, unter Zusatz von 5 g Fluornatrium gewonnen.

1.

	Menge in ccm vor der Diffusion	Menge in ccm nach der Diffusion	Proz. ClNa-Gehalt vor der Diffusion	Proz. ClNa-Gehalt nach der Diffusion
Serum gegen destilliertes Wasser 4 Stunden	50	52	0,59	0,03
Sernm gegen destilliertes Wasser 7 Stunden	50	58	0,59	0,01
Serum gegen destilliertes Wasser 24 Stunden	50	57	0,59	0,03
Serum gegen fließendes Wasser 24 Stunden	50	48	0,59	0,00

2.

Salzlösung gegen destilliertes Wasser 4 Stunden . . .	50	51	0,61	0,091
Salzlösung gegen 0,13 % Salzlösung 4 Stunden . . .	50	50	0,61	0,22

3.

Blut gegen fließendes Wasser 24 Stunden	—	—	—	0,21
Serum gegen das diffundierte Blut 4 Stunden	50	46	0,59	0,43
Salzlösung gegen das diffundierte Blut	50	45	0,61	0,48

Zeit dialysierten Blutes zeigt (Versuch 13), daß der gefundene Chlorgehalt auf Rechnung der Blutkörperchen zu setzen ist.

Die Dialyse von Serum gegen kochsalzarm gemachtes Blut verläuft genau so, wie diejenige einer Salzlösung; es geht das am deutlichsten aus Versuch 12 hervor, wo die 4stündige Dialyse von Serum und von Kochsalzlösung gegen das gleiche kochsalzarme Blut die nämlichen Endwerte lieferte. Versuch 13 lehrt, daß die Diffusion von Serum gegen kochsalzarmes Blut und gegen destilliertes Wasser selbst bei kurzdauerndem Versuch annähernd gleich verläuft. Sowie auf beiden Seiten der trennenden Membran kolloide Lösungen sich befinden, ist der etwaige Einfluß der Zeit

Versuch 13.

1.

	Menge in ccm vor	nach der Diffusion	Proz. Cl Na-Gehalt vor	nach der Diffusion
Geschlagenes Blut 24 Stunden gegen fließendes Wasser .	—	—	—	0,11
Serum von diesem diffundierten Blut	—	—	—	0,02

2.

Serum gegen das diffundierte Blut 4 Stunden	50	48	0,58	0,09
Serum gegen destilliertes Wasser 4 Stunden	50	53	0,58	0,03
Serum gegen diffundiertes Blut 7 Stunden	50	47	0,58	0,04
Serum gegen destilliertes Wasser 7 Stunden	50	55	0,58	0,04

nicht außer acht zu lassen. Während früher der Satz, daß Diffusion in rein kristalloiden und in kolloiden Lösungen gleich schnell verläuft, sich uneingeschränkter Anerkennung erfreute, sind neuerdings Erfahrungen veröffentlicht worden, welche für eine Verlangsamung der Diffusion in kolloiden Lösungen Zeugnis ablegen. Auf diese Frage einzugehen hatte ich keine Veranlassung und das Ergebnis von Versuch 13 rechtfertigt diese Unterlassung für Versuchsbedingungen, deren ich mich zu bedienen hatte.

Diffusion von Hungerblut gegen Blut vom gefütterten Tier.

Gegen alle bisher mitgeteilten Versuche läßt sich der Einwand erheben, daß durch die Versuchsbedingungen künstlich die tatsächlich im Organismus bestehenden Verhältnisse abgeändert werden. Es wäre denkbar, daß das Kochsalz zum Teile kolloid gebunden sei, zum Teil frei gelöst und ein Gleichgewichtszustand zwischen diesen beiden Formen herrschte. Durch Wegdiffusion des frei gelösten Teiles würde der Gleichgewichtszustand gestört und kolloid gebundenes Kochsalz in den frei gelösten Zustand

übergehen und so der Diffusion anheimfallen. Auf diese Weise könnte das im Serum bei Diffusionsversuchen gegen Wasser oder künstlich kochsalzarm gemachtes Blut Resultate wie eine einfache Kochsalzlösung liefern, ohne das in Wirklichkeit zu sein. Ein anderer Einwand, welcher gegen die bisherigen Versuche erhoben werden könnte, würde sich auf die Annahme stützen, daß die kolloide Bindung des Kochsalzes im Blute eine sehr lockere sei und auch sein müsse, sodaß schon der Eintritt von Wasser mittelbar oder unmittelbar die Bindung löst. Dieser Einwand würde auch diejenigen meiner Versuche treffen, in denen ich Serum gegen kochsalzarmes Blut diffundierte; denn um dieses Blut kochsalzarm zu machen, wurde es gegen fließendes Wasser diffundiert.

Um diese etwaigen Bedenken experimentell aus dem Wege zu räumen, habe ich direkt zwei unveränderte Blutsorten gegeneinander diffundiert, von denen das eine einem Hungertiere, das andere einem gut mit kochsalzreichem Futter gefütterten Tiere entstammte. Wenn die Annahme richtig wäre daß im Hungerblute ein Teil oder gar das ganze Kochsalz kolloid gebunden sei, so müßte aus dem Blute eines mit kochsalzhaltigem Futter gefütterten Tieres, in dem das Kochsalz frei gelöst sein soll, Kochsalz in das Hungerblut diffundieren. Die Richtigkeit dieser Erwägung wird durch die Versuche von Zuntz bewiesen, welcher zeigte, daß frei gelöstes Alkali aus einer Lösung in Blut oder Serum diffundierte, welche bei der Analyse gleichen Alkaligehalt zeigten. Daraus, wie auch aus anderen Versuchen folgte, daß nur ein Teil des Alkalis im Blute frei gelöst war.

Die Versuche wurden so angeordnet, daß zwei Kaninchen in zwei verschiedene Käfige gebracht und, abgesehen von der Ernährung, drei Tage lang unter sonst gleichen Bedingungen gehalten wurden. Das eine Kaninchen hungerte, das andere wurde reichlich mit Hafer und etwas Grünfutter gefüttert, die Haferportionen waren mit Kochsalz versetzt. Beide Tiere wurden am vierten Tage durch Verblutung aus beiden Carotiden getötet. Die eine Blutsorte kam in eine Dialysehülse von Schleicher und Schüll, die andere in das Außengefäß. Beide Gefäße blieben gut verschlossen 24 Stunden stehen, dann wurde die Dialyse unterbrochen.

Versuch 14.

Hungerblut gegen Freßblut dialysiert, Hungerblut im Dialysator.

Proz.	Kochsalzgehalt	des Hungerblutes		vor	der	Dialyse	0,498 %
„	„	„	„	nach	„	„	0,490 %
„	„	des Freßblutes		vor	„	„	0,404 %
„	„	„	„	nach	„	„	0,442 %

Versuch 15.

Hungerblut gegen Freßblut dialysiert, Hungerblut im Dialysator.

Proz.	Kochsalzgehalt	des Hungerblutes		vor	der	Dialyse	0,394 %
„	„	„	„	nach	„	„	0,378 %
„	„	des Freßblutes		vor	„	„	0,376 %
„	„	„	„	nach	„	„	0,358 %

Versuch 16.

Hungerblut gegen Freßblut dialysiert, Freßblut im Dialysator.

Proz.	Kochsalzgehalt	des Hungerblutes		vor	der	Dialyse	0,502 %
„	„	„	„	nach	„	„	0,504 %
„	„	des Freßblutes		vor	„	„	0,504 %
„	„	„	„	nach	„	„	0,492 %

Das Ergebnis dieser Versuche spricht unzweifelhaft dagegen, daß im Hungerblut ein Teil des Kochsalzes kolloid gebunden sei und nur ein Teil frei gelöst. Denn wäre dies der Fall, so hätte sich mindestens eine Andeutung davon nachweisen lassen müssen, daß während der Diffusion eine Zunahme des Gesamtchlorgehaltes im Hungerblut stattfinde. Das ist aber nicht der Fall. Durch das Resultat dieser Versuche wird zunächst der Einwand widerlegt, daß in den früheren Versuchen nur deshalb das Kochsalz diffundiert sei, weil durch die Versuchsbedingungen die Bindung gelöst worden sei. Die Gleichartigkeit der beiden gegeneinander diffundierten Flüssigkeiten bedarf keiner weiteren Erörterung. Auch die Möglichkeit, daß durch die Versuchsbedingungen ein etwa bestehender Gleichgewichtszustand zwischen kolloid gebundenen und frei gelöstem Anteil gestört würde, wird durch meine Versuchsanordnung ausgeschlossen. Machen wir die Annahme, daß auf der einen Seite der Diffusionsmembran eine Lösung sich befindet, in welcher kolloid gebundenes und frei gelöstes Chlornatrium im

Gleichgewicht sich befindet, auf der anderen Seite eine Lösung mit frei gelöstem Chlornatrium von gleicher Konzentration wie die Gesamtkonzentration an Chlornatrium in der ersten Lösung, so wird aus der zweiten in die erste Lösung Chlornatrium diffundieren. Diese Störung des Gleichgewichts durch Vermehrung des frei gelösten Teiles wird, falls hier die Gesetze des chemischen Gleichgewichtes gelten, zu einer entsprechenden Vermehrung des kolloid gebundenen Anteils führen: das Endergebnis wäre jedenfalls eine Vermehrung des Kochsalzgehaltes im Hungerblute. Ich glaube daher, daß meine Versuche den Beweis liefern, daß das Kochsalz im Hungerblute ebenso frei gelöst ist wie im Futterblute. Mit dieser Feststellung fallen alle Hypothesen dahin, welche gemacht worden sind, um z. B. die Nichtausscheidung von Kochsalz durch die Niere eines Hungertieres mit Hilfe einer besonderen Bindung des Kochsalzes im Blute zu erklären.

B. Die Bindung des Zuckers im Blute.

Das Verhalten des Zuckers im Blute ist nicht selten Gegenstand der Untersuchung gewesen. Mehr als bei irgend einem anderen im Blute vorkommenden, in Wasser leicht löslichen Stoff ist bei diesem Stoffe die Frage ventiliert worden, ob er nicht kolloid gebunden sei. Die Veranlassung, weshalb diese Ansicht sich geltend machte, waren nicht ausschließlich gewisse Tatsachen, welche bei der Sekretion, insbesondere der Sekretion durch die Niere beobachtet wurden, sondern vor allem waren es gewisse Schwierigkeiten bei der quantitativen Analyse des Blutes, welche verschiedene Forscher veranlaßten, die Meinung auszusprechen, daß der Zucker nicht frei gelöst im Blute vorkomme. Im Verfolg der Kontroversen über die Möglichkeit, quantitativ allen im Blute vorhandenen oder auch künstlich zugesetzten Zucker wieder zu gewinnen, ergab sich aber, daß bei geeigneter Enteiweißung und sorgfältigem Auswaschen des Eiweißniederschlages keine Zuckerverluste eintreten. Natürlich ist hiermit nicht der Beweis geliefert, daß der Zucker, den man bestimmt, auch wirklich ursprünglich frei gelöst im Blute vorkommt. Denn da man sich ziemlich eingreifender Methoden bei der Analyse zu bedienen hat, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß erst im Verlaufe der analytischen Operationen der Zucker aus seiner Bindung gelöst wurde.

Von einigen Autoren, beispielsweise von Henriques[1]) und Bing[2]), wird die Ansicht vertreten, daß der Zucker im Blute gar nicht als solcher vorhanden wäre, sondern als Jekorinlezithinglukose. Diese Anschauung gründet sich darauf, daß reduzierende Stoffe aus dem Blute dargestellt wurden, aus denen Zucker abgespalten werden konnte und deren Reduktionswerte ähnlich denen des Blutzuckers sind. Auch Lépine spricht von einem „sucre virtuel", welcher aus einer festeren Bindung erst abgespalten wird. Inwieweit derartigen Anschauungen eine Berechtigung innewohnt, ist nicht meine Aufgabe zu prüfen, da ich in der Lage bin, den Beweis zu führen, daß der normale Blutzucker frei gelöst im Blute vorkommt.

Wie schon erwähnt, wurden einige Forscher wegen gewisser physiologischer Tatsachen dazu bestimmt, eine kolloide Bindung des Zuckers im Blute anzunehmen. Die wichtigste hier zu nennende Tatsache wäre die Nichtausscheidung von Zucker durch die Niere unter normalen Bedingungen. Kolisch und neuerdings insbesondere O. Loewi[3]) behaupten, daß in der Norm kein Zucker durch die Niere ausgeschieden werde, weil er kolloid gebunden sei; die Ausscheidung trete aber sofort ein, wenn der Zucker im Blute frei gelöst sei, wie das nach intravenöser Zuckerinjektion und im Pankreasdiabetes der Fall sei. An und für sich nötigen diese Tatsachen nicht zur Annahme, daß der normale Blutzucker kolloid gebunden sei. Diese Annahme geschieht vielmehr zugunsten der Vorstellung, daß alle frei gelösten Substanzen im Blute durch die Niere filtriert werden und daher bei jeder auf vermehrter Filtration zustande kommend gedachter Diurese in größerer Menge ausgeschieden werden müssen.

Die Frage nach der physikalisch-chemischen Bindung des Zuckers im Blute muß wohl in erster Linie durch physikalisch-chemische Experimente entschieden werden. Nach dem, was ich oben ausgeführt habe, ist die Diffusion diejenige Methode, welche die Entscheidung bringen kann. Diffusionsexperimente. welche den Blutzucker betreffen, haben zum Unterschiede gegen die früher

---

[1]) V. Henriques, Über die reduzierenden Stoffe des Blutes. Ztschr. f. physiol. Chem. **1897**, 244, Nr. 23.

[2]) H. I. Bing, Über das Jekorin. Zentralbl. f. Physiol. **1898**, 209.

[3]) O. Loewi, Untersuchungen zur Physiologie und Pharmakologie der Nierenfunktion. Arch. f. exp. Pathol. und Pharmak. **48**, 410. 1902.

untersuchten Stoffe zwei neue Schwierigkeiten. Erstens sind die im Blute vorkommenden Zuckermengen sehr gering, zweitens fällt der Blutzucker einer raschen Zersetzung durch das glykolytische Ferment des Blutes anheim.

Die Dialyse ist von Schenck[1]) benutzt worden, um zu prüfen, ob der Zucker im Blute an Eiweiß gebunden sei. Um mit größeren Mengen arbeiten zu können, setzte er den Eiweißlösungen und dem Blute Traubenzucker zu. Die Zersetzung des Zuckers hemmte er durch Zusatz von geringen Mengen Essigsäure. Die Dialyse ergab, daß schließlich die Konzentration des Zuckers auf beiden Seiten der Pergamentmembran die gleiche wurde. Hieraus zog Schenck den Schluß, daß der Zucker nicht an eiweißartige Körper gebunden, sondern frei gelöst im Blute sei. Die Versuche von Schenck sind deshalb nicht ganz streng beweisend, weil noch zwei Einwände möglich sind. Erstens braucht für den im Blute natürlich vorkommenden und den dem Blute zugesetzten Zucker nicht das gleiche zu gelten. Zweitens diffundierte Schenck gegen Wasser.

Ich habe oben bei der Untersuchung der Bindungsverhältnisse von Kochsalz zu zeigen versucht, daß die Diffusion des Blutes gegen Wasser Bedingungen schafft, welche die eventuelle Bindung des Zuckers nicht zum Ausdruck gelangen lassen. Hierzu kommt noch, daß nach Arthus Wasserzusatz zum Blute den Zuckerverlust beschleunigt. Auch Arthus[2]) hat sich der Dialyse bedient. Er unterdrückte die Zerstörung des Zuckers im Blute durch das glykolytische Ferment in einigen Versuchen dadurch, daß er in der Kälte diffundierte, in anderen durch Zusatz von Fluornatrium. Letzteres hebt nach der Entdeckung von Arthus[3]) nicht allein die Blutgewinnung auf, sondern verhindert auch die Entstehung des glykolytischen Fermentes. Die Versuche von Arthus bedeuten insofern einen weiteren Fortschritt, als er nachweisen konnte, daß der normale Blutzucker gegen destilliertes Wasser diffundiert.

---

[1]) Fr. Schenck, Über Zuckerbestimmung im Blute. Pflügers Arch. **47**, 621. 1890.

[2]) M. Arthus, Application de la dialyse à la solution de quelques questions de chimie physiologique. Ztschr. f. Biologie, N. P. B. **16**, 432. 1896.

[3]) M. Arthus, Sur le ferment glycolytique. C. R. Soc. de Biol. **48**, 65. 1891. M. Arthus, Glycolyse dans le sang. Comp. rend. **114**, 605. 1892.

Die Versuchsanordnung, deren ich mich bediente, hatte zum Zweck, zwei Blutsorten gegeneinander zu diffundieren, welche sich nur durch ihren Zuckergehalt voneinander unterschieden. Alle früher erwähnten Fehlerquellen und prinzipiellen Bedenken waren hierdurch ausgeschlossen. Es wurden, um das gewollte Ziel zu erreichen, zwei Blutportionen von demselben Tier und zwar vom Rinde aufgefangen, die eine in einen Kolben, welcher Fluornatrium enthielt und zwar soviel, daß auf je ein Liter Blut 3 g Fluornatrium kamen. Eine zweite Portion Rinderblut wurde aufgefangen und defibriniert. Das defibrinierte Blut wurde mit reiner Hefe versetzt und blieb 24 Stunden stehen; nach 24 Stunden war daraus fast aller Zucker verschwunden. In einem Versuch wurde der Zuckergehalt des Blutes durch 24stündiges Stehenlassen ohne Hefezusatz auf einen sehr kleinen Betrag herabgemindert. Das zuckerarme Blut wurde beim Beginn der Dialyse gleichfalls mit Fluornatrium im selben Verhältnis wie beim andern Blut versetzt, damit nicht das im Schlauche befindliche Blut bei der Dialyse sein Fluornatrium verliere, wodurch Gelegenheit zur Entstehung des glykolytischen Fermentes gegeben wäre. Beide Blutsorten wurden außerdem zum Schutz gegen Fäulnis mit Toluol versetzt. Eine gemessene Menge des Fluornatriumblutes mit einem normalen Zuckergehalt kam in den Dialysatorschlauch, in das große Außengefäß kam die vielfache Menge von zuckerarmem Blut. Die Dialyse wurde 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur im Gang belassen. Eine Portion Fluornatriumblut wurde getrennt am gleichen Ort aufbewahrt, um dann mit den anderen gleichzeitig auf Zucker analysiert zu werden.

Die Enteiweißung der Blutsorten geschah nach Seegens Methode; ich habe dieselbe in der folgenden Weise ausgeführt: 100 ccm Blut wurden mit 7 ccm 50%iger Essigsäure versetzt, auf das 10fache mit Wasser verdünnt und erhitzt. Kurz vor dem Sieden müssen 30—35 cm^3 20%iger Na_2CO_3-Lösung hinzugefügt werden. Unter lebhaftem Rühren läßt man die Flüssigkeit einige Minuten lang aufkochen. Dann filtrierte ich durch ein in der Käserei gebräuchlichen Filterstoff, wusch den Niederschlag dreimal mit heißem Wasser aus und brachte ihn dann wieder in die Schale, wo er mit Wasser verrührt wieder aufgekocht wird. Die Filtrate werden vereinigt, der Niederschlag wird gut auf dem Filter gewaschen. Die ganze Prozedur wird dann noch ein zweites Mal

mit dem Niederschlag wiederholt. Die schließlich erhaltene Flüssigkeit muß wasserklar sein, ein Zeichen, daß die Enteiweißung vollständig. Nach dem Eindampfen der großen Flüssigkeitsmengen auf ein kleines Volumen wird erforderlichen Falles noch einmal filtriert und in einem aliquoten Teil die Zuckeranalyse ausgeführt. Der Zucker wird nach der Allihnschen Methode bestimmt, wie sie Pflüger vorschreibt. Nach der Wägung des im Wasserstoffstrom reduzierten Kupfers habe ich das Kupfer wieder aufgelöst und das Röhrchen zurückgewogen.

Versuch 17.	Zuckergehalt in 100 ccm Blut.
Blut, welches 24 Stunden lang mit Hefe versetzt war	9,75 mg
Fluornatriumblut, 24 Stunden gegen Hefeblut diffundiert	11,00 „
Ursprüngliches Fluornatriumblut, zur selben Zeit in Arbeit genommen, als die Diffusion unterbrochen wurde	76,60 „

Versuch 18.	
Blut, welches 24 Stunden lang gestanden hatte	14,80 mg
Fluornatriumblut, 24 Stunden gegen gestandenes Blut diffundiert	8,90 „
Ursprüngliches Fluornatriumblut, zur selben Zeit in Arbeit genommen, als die Diffusion unterbrochen wurde	68,60 „

Versuch 19.	
Blut, welches 24 Stunden lang mit Hefe versetzt war	0,30 mg
Fluornatriumblut, 24 Stunden gegen Hefeblut diffundiert	11,00 „
Ursprüngliches Fluornatriumblut, zur selben Zeit in Arbeit genommen, als die Diffusion unterbrochen wurde	68,60 „

Versuch 20.	
Blut, welches 24 Stunden lang mit Hefe versetzt war	0,00 mg
Fluornatriumblut, gegen Hefeblut 24 Stunden diffundiert	40,40 „
Ursprüngliches Fluornatriumblut, zur selben Zeit in Arbeit genommen, als die Diffusion unterbrochen wurde	154,00 „

Versuch 21.	Zuckergehalt in 100 ccm Blut.
Blut, welches 24 Stunden lang mit Hefe versetzt war	0,00 mg
Fluornatriumblut, gegen Hefeblut 24 Stunden diffundiert	0,00 „
Ursprüngliches Fluornatriumblut, zur selben Zeit in Arbeit genommen, als die Diffusion unterbrochen wurde	78,00 „

In allen mitgeteilten Versuchen zeigt sich, daß der normale Blutzucker, welcher im Fluornatriumblut vorhanden war, wie die Kontrollanalyse ergibt, entweder ganz oder bis auf geringe Mengen verschwunden war. Da meine Versuchsanordnung derart war, daß der in die Außenflüssigkeit, nämlich in das zuckerfreie Blut, übertretende Zucker dort der Zerstörung anheimfiel, konnte ich nicht den Fall realisieren, daß auf beiden Seiten der Pergamentmembran Gleichheit der Zuckerkonzentration erreicht wurde. Es erwuchs mir daher noch die Aufgabe, mich zu versichern, daß nicht etwa aus der Außenflüssigkeit in den Dialysatorschlauch glykolytisches Ferment gedrungen war, welches den Blutzucker des im Dialysatorschlauch befindlichen Blutes zerstört hatte.

Das Verfahren, dessen ich mich zu dieser Prüfung bediente, war folgendes: Nach Unterbrechung der 24stündigen Diffusion habe ich 50 ccm des im Dialysatorschlauche befindlichen Blutes, von dem eine andere Portion sich zuckerfrei erwies, mit 50 ccm reiner Zuckerlösung versetzt. 25 ccm dieser Lösung wurden gleich in Arbeit genommen und der Zuckergehalt darin analysiert. Der Rest, 75 ccm, blieb 24 Stunden stehen. Nach Verlauf von 24 Stunden wurde wiederum in 25 ccm der Lösung der Zucker analysiert. Die nachfolgenden Versuche geben die erhaltenen Resultate.

Versuch 22.	Zuckergehalt in 100 ccm Lösung.
Zuckerlösung + diffundiertes Blut sofort untersucht .	521 mg
Nach 24 Stunden	527 „

Versuch 23.	
Zuckerlösung + diffundiertes Blut sofort untersucht .	135,6 mg
Nach 24 Stunden	128,6 „

Der dem diffundierten Blute zugesetzte Zucker wird also nach 24 Stunden in unverminderter Menge wiedergefunden. Hiermit ist der Beweis geliefert, daß in dem Dialysatorschlauch nichts vorhanden war, was Zuckerzerstörung hervorrufen konnte. Es waren sowohl die ursprünglichen Zusatzmittel gegen glykolytisches Ferment und Fäulnis ausreichend, wie auch war im Verlauf der Diffusion kein zuckerzerstörendes Moment in den Dialysatorschlauch eingedrungen.

Meine Versuche lehren mit aller Sicherheit. daß der im Blute natürlich vorkommende Zucker aus dem Blute durch Diffusion verschwindet und zwar auch dann, wenn die Außenflüssigkeit selbst wieder Blut gleicher Zusammensetzung, abgesehen vom Zuckergehalt, ist. Es ist einzig und allein die Konzentrationsdifferenz, demnach die Differenz des osmotischen Druckes, welche den Zucker durch die Pergamentmembran treibt; in den Versuchsbedingungen ist keine vorhanden, welche eine etwaige Bindung löst. Eines der wichtigsten Kriterien, welches wir als Beweis für den frei gelösten Zustand haben, ist somit für den Blutzucker erfüllt und es darf der Satz ausgesprochen werden, „der normale Blutzucker befindet sich frei gelöst, im diffusionsfähigen Zustand im Blute“.

Mit dem Nachweise, daß der normale Blutzucker frei gelöst im Blute ist, fallen einige Hypothesen dahin, die sich auf die Annahme einer kolloiden Bindung des Zuckers gründen. Das Verhalten des Zuckers bei der Diurese kann nicht mehr erklärt werden aus einer festeren Bindung desselben. Der Nichtübertritt des diffusionsfähigen Zuckers aus dem Blute in den Harn und in andere Sekrete hat Ursachen, die in den Eigenschaften der betreffenden Zellen zu suchen sind, nicht in der Bindungsart des Blutes[1]).

[1]) Nach Abschluß dieser Arbeit erschien von Lépine und Boulud [Compt. rend. Acad. Franc. t. **148**, 539] eine Mitteilung, in welcher im Anschluß an die vorläufige Mitteilung dieser Resultate im Centralbl. f. Physiol. **19**, Nr. 14, 1905 mit Hilfe der Diffusion die Bindungsverhältnisse des Zuckers untersucht werden. Die Autoren diffundierten bei niederer Temperatur und nur zwei Stunden lang. Die diffundierten Zuckermengen sind dementsprechend gering, aber immerhin mit Ausnahme eines Versuches, merklich. Diese Versuche beweisen demnach nicht, wie es Lepine und Boulud wollen, daß der Blutzucker nicht diffusionsfähig ist. Wenn der Zuckergehalt des Blutes künstlich gesteigert wird, ist auch bei ihren kurzdauernden Versuchen wegen des Konzentrationsunterschiedes, nicht wegen anderer Bindung, die Diffusionsgeschwindigkeit größer.

Die wesentlichsten Resultate meiner Arbeit sind folgende:

1. Die von Buffa angewandte Methode des partiellen Ausfrierens von Serum ist an und für sich nicht geeignet, die Frage zu entscheiden, ob das Serum eine Flüssigkeit von Molekülen eigener Art oder eine Lösung sei. Selbst bei einer einfachen Lösung z. B. Kochsalzlösung, ergibt die Analyse des partiell ausgefrorenen und des nicht ausgefrorenen Teiles andere Werte, als man der Theorie nach vielleicht erwartet hätte. Erst recht gilt es für Lösungen, welche kolloide Bestandteile enthalten. Der Grund für dieses Verhalten ist in dem von Quincke aufgedeckten Ausscheidungsverhältnisse von Eis zu suchen.

2. Das Kochsalz kommt im Blutserum jederzeit frei gelöst vor. Blutserum läßt sich durch Diffusion sowohl gegen Wasser wie auch gegen kochsalzarmes Blut seines Kochsalzgehaltes berauben. Auch in bezug auf die zeitlichen Verhältnisse gestaltet sich die Diffusion des Kochsalzes aus dem Serum genau wie bei einfacher Kochsalzlösung. Blut eines hungernden Tieres gegen Blut eines gut gefütterten Tieres diffundiert, ergibt keine Anhaltspunkte dafür, daß im Hungerblute das Kochsalz etwa fester gebunden sei.

3. Blut von normalem Zuckergehalt läßt sich durch Diffusion gegen zuckerfreies Blut von sonst gleicher Zusammensetzung seines Zuckergehaltes berauben. Der osmotische Druck des gelösten Zuckers stellt hierbei die einzig in Betracht kommende Triebkraft dar. Der normale Blutzucker ist also in einem frei gelösten Zustande im Blute.

Über den Einfluß des Druckes auf die Resorption im Unterhautbindegewebe.

Nach Versuchen von Dr. C. Thomassen.

Von

H. J. Hamburger.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 10. Januar 1907.)

Einleitung.

Mit Rücksicht auf subkutane Einspritzungen von Arzneimitteln und auf die Anlegung von Verbänden bei ödematösen Schwellungen ist es nicht unwichtig, zu erforschen, welchen Einfluß der Druck auf die Resorption von Flüssigkeiten im Unterhautbindegewebe ausübt. Insbesondere auch vom theoretischen Gesichtspunkte aus, nämlich zur Beantwortung der Frage, welche Faktoren bei dem Resorptionsprozeß im Spiele sind, dürfte es wichtig sein, diesen Einfluß des Druckes zu studieren.

Schon früher untersuchte ich den Einfluß des Druckes auf die Resorption in der Bauchhöhle und verfuhr dabei in folgender Weise[1]):

Nachdem in die Linea alba eine kleine Öffnung gemacht worden ist, wird ein Rohr eingeführt, das mittels einer geeigneten Vorrichtung wasser- und luftdicht in die Öffnung paßt. Mit diesem Rohr steht mittels Gummischlauch ein Glastrichter in Verbindung, welcher am Halse einen roten Strich trägt.

---

[1]) H. J. Hamburger, Über den Einfluß des intraabdominalen Druckes auf die Resorption in der Bauchhöhle. Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Phys. Abt. **1896**, 305 u. 326. Weiter Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre **2**, 118 ff. 1904.

Es wird nun so lange eine Flüssigkeit in die Bauchhöhle gegossen, bis dieselbe den Strich erreicht hat. Dann wird eine bestimmte Flüssigkeitsmenge hinzugefügt und gewartet, bis das Niveau sich bis zum roten Striche gesenkt hat. Ausdehnung von Bauchwand und Zwerchfell wird vorgebeugt. Durch Heben und Senken des Trichters kann der intraabdominale Druck nach Willkür geregelt werden.

Die Zeit, welche jedesmal die Flüssigkeit braucht, um zum roten Strich zu gelangen, ist ein Maß für die Resorptionsgeschwindigkeit bei den verschiedenen intraabdominalen Druckwerten.

Als Resultat der Versuche ergab sich:

1. Daß, wenn der intraabdominale Druck von 2 bis 6 cm steigt, die Resorption zuweilen bis zum doppelten zunimmt.

2. Weniger stark, aber jedenfalls noch bedeutend, steigt die Resorption bei einer Druckerhöhung von 9 bis 11 cm.

3. Bei einer Druckzunahme von 14 bis 20 cm ist die Resorption bald unzweifelhaft ein wenig vermehrt, bald wieder unverändert geblieben, aber zuweilen auch deutlich vermindert.

4. Bei einer Drucksteigung von 20 bis 30 cm ist immer eine bedeutende Abnahme der Resorption zu beobachten.

Bei allen Versuchen waren durch Unterbindung des Ductus thoracicus die Lymphbahnen ausgeschlossen. Deshalb konnten wir das Resultat dahin formulieren: Die Resorption von Flüssigkeiten seitens der Blutgefäße ist in hohem Maße vom hydrostatischen Druck abhängig, unter welchem die Flüssigkeiten sich befinden.

Diese Resultate ließen erwarten, daß auch im Unterhautbindegewebe Erhöhung des Druckes bis zu einem gewissen Grade auch Zunahme der Resorption zur Folge haben würde.

Nun hatten die Untersuchungen von Starling[1]) diesen Forscher zu dem Resultat geführt, daß bei einer Steigerung des Druckes der in das Unterhautbindegewebe eingeführten Flüssigkeit die Resorption gerade abnehme; von einem Übergang von Flüssigkeit in die Blutkapillaren („Backfiltration") könne gar nicht die Rede sein. Wie ich aber früher auseinandergesetzt habe[2]), scheinen Starlings Ausführungen nicht einwandfrei zu sein.

---

[1]) Starling, On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. The Journal of Physiol. **19**, 318. 1896.

[2]) Osmotischer Druck und Ionenlehre **2**, 150 ff.

Starling experimentierte folgenderweise:

Bei einem Hund mittlerer Größe wurde das Blut erst defibriniert und dann wieder injiziert. Dann wurde eine T-Kanüle in den Verlauf einer der Dorsalvenen des Fußes eingebunden und mit einem mit Salzlösung gefüllten Manometer in Verbindung gebracht. Höher, in der Richtung des Knies, wurde in die V. Saphena interna eine Kanüle gebracht, durch welche Blut abfließen konnte. Das ausfließende Blut wurde aufgefangen und gemessen. Ferner wurde eine scharfe Kanüle in das Unterhautbindegewebe in der Nähe der V. Saphena interna gesteckt. Diese Kanüle stand in Verbindung mit einer mit Kochsalzlösung gefüllten Flasche, deren Höhenlage verändert werden konnte. Endlich wurden zwei Southey-Röhrchen, C und D, in verschiedener Höhe in das Unterhautbindegewebe gesteckt; sie standen mit Wassermanometern in Verbindung.

Es folgt hier eine von Starling mitgeteilte Versuchsreihe:

Einfluß des extravaskularen Druckes[1]) auf den Blutstrom in den Venen.

Zeit	Vena	Injektionsnadel	Southey-Röhre D	Southey-Röhre C	Aus der Vena Saphena tröpfelnde Blutmenge (in 10 Minuten) ccm
2 U. 25 Min.	—	—	—	—	4,2
2 „ 35 „	122	—	—	—	2,8
2 „ 50 „	118	—	—	—	28 (15 Minuten)
3 „ 00 „	108	—	—	—	18
3 „ 10 „	103	—	—	—	15
Injektion einer 1% NaCl-Lösung in das Unterhautbindegewebe.					
3 U. 20 Min.	105	315	—	—	1,3
3 „ 30 „	?	315	—	155	0,8
3 „ 40 „	133	355	145	155	0,4
3 „ 50 „	170	265	157	165	0,4
Injektion hört auf.					
4 „ 00 „	120	107	103	94	0,5
4 „ 15 „	110	80	80	70	1,8 (15 Minuten)
Injektion fängt wieder an.					
4 „ 25 „	183	235	130	155	1,3
4 „ 40 „	220	245	160	180	1,8 (15 Minuten)
4 „ 50 „	160	110	110	102	1,3
5 „ 00 „	145	93	97	88	1,6
5 „ 10 „	137	80	95	75	1,8
5 „ 20 „	132	76	87	68	2,0
5 „ 30 „	127	70	85	67	2,4

[1]) Der extravaskulare Druck und auch der Venendruck ist angegeben in mm Wasser.

Aus diesen Versuchsergebnissen folgert Starling, daß bei Steigerung des durch künstliches Ödem herbeigeführten Druckes im Unterhautbindegewebe:

1. der Blutdruck in den Fußvenen zunimmt;
2. der Ausfluß des Blutes aus der V. Saphena abnimmt.

Er interpretiert das folgendermaßen:

Wenn im Verlauf der V. Saphena das künstliche Ödem einen Druck ausübt, so wird letzterer auch diese Vena treffen, was zur Folge haben wird, zunächst daß unterhalb der Druckstelle, also in den Fußvenen und Kapillaren, durch Beeinträchtigung des Abflusses des heranströmenden Blutes eine Stauung, also eine Blutdrucksteigerung stattfindet. Oberhalb der Druckstelle wird der Abfluß ebenfalls verringert sein. Studiert man aber den ersten Teil der Tabelle, so erhebt sich einiger Zweifel an der Richtigkeit von Starlings Schlußfolgerung. Um $3^h 20'$ nämlich ist bei einem Injektionsdruck von 315 mm der Ausfluß ebenso groß wie um $4^h 25'$ bei einem Injektionsdruck von 235 mm und um $4^h 50'$ bei einem Injektionsdruck von 110 mm. Andererseits aber sieht man im letzten Stadium des Versuchs ($4^h 50'$ bis $5^h 30'$) bei einer Druckabnahme der zu injizierenden Flüssigkeit von 110 bis auf 70 mm eine regelmäßige Steigung des Blutausflusses aus der Vena, was in der Tat zugunsten der von Starling vertretenen Ansicht redet.

Es erhebt sich noch eine zweite Schwierigkeit. Wir wollen vorläufig mit dem Autor annehmen, daß wirklich mit gesteigertem extravaskularen Druck der Ausfluß von Blut aus den Venen abnimmt, darf man dann mit ihm ohne weiteres daraus schließen, daß auch die Resorption abnimmt?

Ich habe bereits früher[1]) Zweifel darüber ausgesprochen. Zunächst, bemerkte ich, wurde bei Verfassers Versuchsanordnung der Druck nicht gerade da ausgeübt, wo dessen Einfluß auf die Resorption zur Äußerung kommen konnte. Zu diesem Zweck hätte er am Fußrücken injizieren müssen, und nicht im Verlauf der V. Saphena, wo diese bereits ein großes Gefäß bildet, das wohl zusammengedrückt werden kann, aber nicht selbst zum Resorbieren imstande ist; aber auch wenn der Druck wirklich am Fußrücken ausgeübt wäre, war es dann nicht möglich, daß derselbe in den

[1]) A. a. O. S. 156.

Versuchen Starlings zu hoch war? Es könnte sich doch hier um einen ähnlichen Fall handeln, wie beim Einfluß des Druckes auf die Resorption in der Bauchhöhle. Bei sehr geringen hydrostatischen Druckwerten nahm die Resorption mit dem Druck zu, bei höheren Werten nahm sie ab. Die Ursache dieser Erscheinung fand ich darin, daß bei geringerem extrakapillaren Drucke die Resorption in die Kapillaren befördert wird, ohne daß der Abfluß von Blut aus den Venen in merkbarer Weise beeinträchtigt wird. Ist dagegen der extrakapillare Druck bedeutend, so wird zwar dadurch der Übergang von Ödemflüssigkeit in die Blutkapillaren befördert, aber indem jetzt die Zusammendrückung der abführenden Vena sich auf die Abfuhr des Blutes in quantitativ nicht zu vernachlässigendem Sinne geltend macht, wird schließlich die Resorption doch beeinträchtigt. Wir haben nun auf experimentellem Wege untersucht, ob unter etwa anderen Versuchsbedingungen als die, unter welchen Starling gearbeitet hatte, bei erhöhtem extrakapillaren Druck nicht eine Steigerung der Resorption stattfinden könnte.

I. Versuchsverfahren.

In der Hauptsache wurde folgenderweise experimentiert:

Bei einem durch Verblutung frisch getöteten Tiere wurde gleichzeitig durch die beiden Hinterbeine defibriniertes Blut geführt. Dann wurde am Fußrücken ein künstliches Ödem von Salzlösung hergestellt und die beiden Ödeme unter verschiedenem Druck gehalten. Man hätte nun untersuchen können, inwieweit die beiden Blutportionen, infolge einer etwaigen differenten Aufnahme von Salzlösung, eine verschiedene Verdünnung erfahren hatten.

Letztere Methode schien aber nicht empfehlenswert, da die durchzuleitende Blutmenge gegenüber den zu resorbierenden Ödemproben zu groß schien, um ausgeprägte Resultate zu liefern.

Deshalb wurde in anderer Weise verfahren. Es wurde von gleichen Volumina isotonischer $NaCl$-Lösung und $NaNO_3$-Lösung an beiden Beinen eingespritzt und die beiden Ödeme unter differentem Druck gehalten. Nachdem durch die beiden Beine die gleiche Blutmenge durchgeführt war, wurde der Gehalt der zwei Blutsera an Cl und NO_3 ermittelt und konnte also festgestellt werden, ob der Druck die Resorption beeinflußt hatte.

Jetzt einige weitere Besonderheiten.

1. Das Versuchstier und die Durchleitung des Blutes.

Da für unsere Versuche Kaninchen zu kleine Tiere sind und große Hunde schwer zu bekommen waren, fiel die Wahl auf junggeborene, nur einige Tage alte Kälber, freilich ein ziemlich kostbares Material, das aber doch im Frühjahr in hinreichender Anzahl zu bekommen ist.

Anfänglich versuchten wir, nach dem Vorgang Starlings, beim lebenden Tier zu experimentieren; hierzu war eine vorherige Defibrinierung des Blutes unumgänglich.

Zu diesem Zweck wurde die A. carotis und die V. jugularis bloßgelegt. Sodann wurde einigemale nacheinander aus der Schlagader etwa ein Liter Blut in eine auf 37° C. erwärmte Schale aufgefangen, in derselben defibriniert und, nach Entfernung des Fibrins, wieder durch die Halsader unter niederem Drucke in den Körper zurückgeführt. Während dieser Verrichtung starb jedoch das junge Tier trotz aller Fürsorge, ohne daß die Ursache nachgewiesen werden konnte.

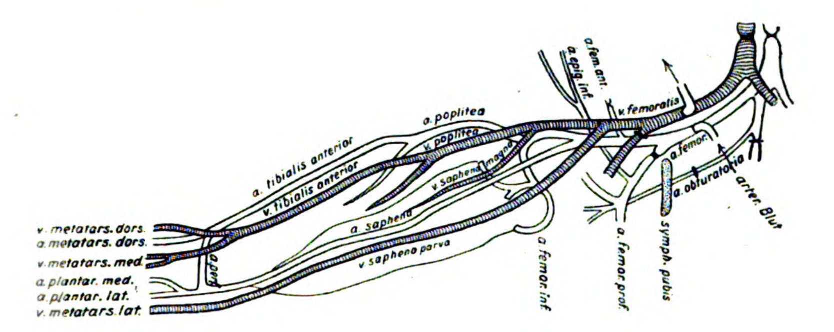
Um der Gefahr vorzubeugen, mehr Kälber auf diese Weise zu verlieren, wurde durch die Beine des schnell durch Verblutung getöteten Tieres unmittelbar auf 37° erwärmtes frisches defibriniertes Rinderblut geleitet. Zu diesem Zweck wurden möglichst rasch die Art. und Vena femoralis präpariert und mit Glasröhrchen versehen. Unter den nötigen Kautelen wurde dann die Arterie mit einem 1,8 m hoch stehenden Gefäß in Verbindung gebracht, das das auf 37° gebrachte und gehaltene arterialisierte Rinderblut enthielt. Das dunkle venös gewordene Blut verließ die V. femoralis.

Der Blutstrom hatte anfangs eine genügende Schnelligkeit. Später nahm die Schnelligkeit sichtlich ab, was wir anfangs glaubten einem Fehler beim Defibrinieren des Rinderblutes zuschreiben zu müssen. Sicherheitshalber fügten wir deshalb beim folgenden Versuche dem defibrinierten Blute 0,2% Natriumoxalat zu, einer Substanz, gegenüber welcher die roten Blutkörperchen sich indifferent verhalten.

Aber auch jetzt kam es nicht zu einer genügenden Durchströmung. Bald zeigten sich Gerinnsel, sowohl im Glasröhrchen wie im Gummirohr. Wahrscheinlich war bei der Verblutung des Tieres noch etwas Blut in den Gefäßen zurückgeblieben. Bei den folgenden Experimenten suchten wir diesem Übelstande dadurch

vorzubeugen, daß wir vor der Einspritzung der Ödemflüssigkeit die Gefäße mit defibriniertem Rinderblut kräftig durchspülten. Das Rinderblut, dem 0,2 % Natriumoxalat zugesetzt war, blieb jetzt wieder gut flüssig, so daß die Durchströmung anfangs genügend war. Jedoch verringerte sich auch bei diesen Versuchen der Blutstrom zuweilen zusehends.

Die Ursache schien folgende: Wegen der tiefen Lage der Gefäße im Schenkelkanal sind die Röhrchen, durch welche das Blut in die Blutgefäße und aus denselben geführt wird, zwischen den Muskeln, die jenen Kanal bilden, eingeklemmt. Bei der geringsten Verlagerung des Beines oder Zusammenziehung dieser Muskeln werden die Röhrchen in eine der Richtung der Blutgefäße nicht mehr entsprechende Lage versetzt, was eine Verengerung des Lumens der Gefäße und infolgedessen einen trägeren Gang des Blutlaufes zur Folge haben kann.



Um diesem Übelstande aus dem Wege zu gehen, wurden bei den folgenden Experimenten die Röhrchen in den Beckenteil der linken und rechten Arteria und Vena femoralis eingeführt. Zu diesem Zwecke wurde der Bauch in der Linea alba geöffnet, das Becken in der Symphysis pubis gespalten, die Blase und das Rectum entfernt, und die Gefäße auspräpariert. Die anastomosierenden Gefäße: die Arteria und Vena hypogastrica, die Arteria obturatoria und sacralis lateralis wurden unterbunden. Sodann wurde eine Ligatur um die Aorta abdominalis und die Vena cava gelegt.

Durch die Unterbindung der Arteria femoralis profunda und anterior wurde verhindert, daß ein Teil des Blutes in der Muskelmasse, in der diese Arterien sich verzweigen, zirkuliere, ohne mit dem Ödem in Berührung zu kommen.

Die Lage der Röhrchen in der Beckenhöhle war geräumig; man konnte jede Änderung des Standes bald erkennen und beseitigen.

Bei dieser Versuchsanordnung war die Durchströmung oft eine recht befriedigende.

Dennoch mußten mehrere Experimente erfolglos beendigt werden, so daß das Belegmaterial, obgleich ganz genügend und zuverlässig, nicht einen der großen Anzahl Versuchstiere entsprechenden Umfang bekommen hat.

2. Die Blutreservoire und die Injektion der Ödemflüssigkeiten.

Auf einem Gestell, hoch über dem Tisch, auf dem das Versuchstier liegt, befindet sich eine große zinkene Wanne mit Wasser, in der sich zwei Literflaschen mit definibriertem Rinderblut befinden. Das Blut wird auf 38° gehalten.

Die Flaschen sind mit einem dreifach durchbohrten Kork beschlossen. Ein Loch gestattet den Durchgang einem Trichter, dessen Stiel fast zum Boden der Flasche reicht, das zweite Loch einem Thermometer, das dritte einem umgebogenen Glasrohr, das mittels Gummischlauch mit der A. femoralis in Verbindung steht. Der Gummischlauch der einen Flasche führt zur rechten, der der anderen Flasche zur linken A. femoralis. Das in jeder Vena femoralis eingebundene Rohr verzweigt sich in zwei Abflußröhren, von denen je eins in einen Meßzylinder reicht. Einer der beiden Abschlußschläuche ist immer zugeklemmt, so daß das Blut nur in ein Gefäß abläuft. Ist letzteres gefüllt, so wird der entsprechende Zufluß abgeklemmt und der andere geöffnet. Auf diese Weise wird vorgebeugt, daß der Abfluß des Blutes unterbrochen wird. Jeder Meßzylinder ist von einem doppeltdurchbohrten Kork verschlossen. Das eine Loch läßt das Abflußrohr hindurch, das andere Loch ein mit Chlorcalcium gefülltes Rohr.

Es ergab sich, daß die Wasserverdunstung des Blutes in den Meßgläßern sehr gering war. Die Chlorcalciumröhren nahmen, wie aus zwei Experimenten hervorging, nur wenig an Gewicht zu:

Experiment a: rechts 0,030 + 0,059 = 0,089 g
links 0,098 + 0,087 = 0,185 g
0,274 g

Experiment b: rechts 0,001 + 0,087 = 0,159 g
links 0,099 + 0,200 = 0,299 g
0,458 g.

Mehr Wasser aber dürfte bei dem wiederholten Umgießen des Inhaltes aus den Meßgläsern in den Trichter des Druckgefäßes verdunstet sein. Dies ließ sich jedoch ohne größere Komplikationen am Apparat nicht vermeiden. Fügen wir noch hinzu, daß die Blutmenge, mit welcher jedes Bein einigemale durchströmt wurde, 750 ccm betrug. Ungefähr 100 ccm wurden als Vergleichsflüssigkeit zur Seite gestellt, so daß im ganzen $2 \times 750 + 100 = 1600$ ccm Rinderblut benutzt wurde.

Die Ödemflüssigkeiten bestanden aus isotonischen Salzlösungen: 0,9 % NaCl und 1,03 % $NaNO_3$, welche einzeln oder in verschiedenen Mischungen, unter einem bestimmten Drucke in das Unterhautbindegewebe eingespritzt wurden. Diese Einspritzung geschah durch 2 Nadeln, welche an der Innen- und Außenfläche jedes Beines unter die Haut gestochen wurden und welche mit einer Druckflasche, in der sich die Salzlösung befand, mittels einer Kautschukröhre verbunden wurden. Aus dem auf S. erwähnten Grunde wurde am Fuß injiziert, anfänglich an der Unterfläche der dritten Phalange, später aber stellte sich heraus, daß der betreffende Metatarsus sich besser eignete. Nach jedem Versuche wurde stets nachgesehen, ob das Ödem sich über eine hinreichende Fläche ausgebreitet hatte und ob die Kanüle etwa Blutgefäße verletzt hatte.

3. Chemische Untersuchung von Serum und Ödemflüssigkeit.

Um das Serum zu bekommen, wurde das defibrinierte Blut in eine kräftige Zentrifuge gebracht. Die auf diese Weise erhaltene Flüssigkeit war immer vollkommen klar.

Bestimmung der festen Bestandteile.

Die festen Bestandteile wurden ermittelt, indem 10 ccm in einer voraus gewogenen kleinen Porzellanschale bei einer Temperatur von 100° bis 105° C. zum Trocknen eingedampft wurden. Dieses Verfahren wurde so lange fortgesetzt bis keine Gewichtsabnahme mehr erkennbar war.

Das Entfernen des Eiweißes aus den serösen Flüssigkeiten.

Um das Cl und andere anorganische Säureradikale quantitativ in eiweißhaltigen Flüssigkeiten zu bestimmen, ist es gewöhnlich notwendig, eine Entfernung des Eiweißes vorangehen zu lassen.

Es stehen hierzu die folgenden vier Methoden zur Verfügung, welche hier auch benutzt worden sind.

1. 10 ccm Ödemflüssigkeit wurde mit 20 ccm gesättigter chlorfreier $(NH_4)_2SO_4$-Lösung versetzt, das Gemisch in einer geschlossenen Flasche im Wasserbade erhitzt, und nach Abkühlung filtriert.

2. 10 ccm des zu untersuchenden Serums wurden mit 90 ccm destilliertem Wasser verdünnt in einem Kolben, welcher mit einem mit kleiner Öffnung versehenen Kork verschlossen war.

Sodann wurde das verdünnte Serum kräftig erhitzt und wurden vorsichtig einige Tropfen verdünnter Esssigsäure hinzugefügt, bis das Eiweiß sich in großen Flocken abschied.

Nachdem die Flüssigkeit abgekühlt war, wurde filtriert. Man kann das Eiweiß als vollkommen entfernt betrachten, wenn das Filtrat vollständig klar und farblos aussieht.

3. Das zur Bestimmung der festen Bestandteile bereits getrocknete Serum wurde unter Vermeidung starker Hitze in einem Tiegel eingeäschert. Die zurückgebliebene kohlehaltige Asche wird mit kleinen Portionen Wasser ausgekocht. Nach Abkühlung wird zu 70 ccm mit Wasser verdünnt und dann filtriert.

4. Zu 10 ccm Ödemflüssigkeit wurde ein Übermaß von alkoholischer Tanninlösung hinzugefügt. Nachdem die Flüssigkeit mäßig erhitzt worden war, wurde filtriert.

Das eventuell vorhandene Eiweiß wurde durch die Tanninlösung niedergeschlagen und blieb auf dem Filter.

In den unter II beschriebenen Versuchen wurde für die Jod- oder Stickstoffbestimmung das Eiweiß nach Methode 2 entfernt und für die Chlorbestimmung nach Methode 3 gearbeitet.

Bei den unter III und IV beschriebenen Experimenten wurde für die Stickstoffbestimmung Methode 4 gebraucht und für die Chlorbestimmung Methode 1.

Die Wahl zwischen den 4 Methoden wird hauptsächlich bestimmt durch die Erwägung, daß, wenn in einer eiweißhaltigen Flüssigkeit viel Eiweiß vorhanden ist, das Volum des Niederschlags, die Konzentration der gelösten Bestandteile in nicht zu vernachlässigendem und auch in nicht genau anzugebendem Grade bei der Berechnung beeinflußt.

Weiter ist die Anwesenheit einer konzentrierten $(NH_4)_2SO_4$-Lösung nicht selten schädlich für die quantitative Bestimmung gelöster Substanzen. Und drittens hat auch die Einäscherung zuweilen ihre Nachteile, indem sie durch Neubildung von Phosphaten, Sulfaten und Karbonaten und bei starker Erhitzung, durch Verdampfung von NaCl und KCl, ein falsches Bild von der Zusammensetzung der serösen Flüssigkeit mit Bezug auf die mineralen Bestandteile gibt.

Stickstoff-Bestimmung.

Für die quantitative Bestimmung des Stickstoffs wurde die Methode von Ulsch gewählt.

Hierzu benutzt man einen Glaskolben von 600 ccm Inhalt. Derselbe ist verschlossen mittels eines Kautschuckstopfens, durch welchen ein

kolbenförmiger Tropfenfänger geschoben ist, wie das auch bei der Kjeldahlschen Stickstoffbestimmungsmethode beim Abdestillieren des Ammoniaks gebräuchlich ist.

Der unter dem Kautschuckstopfen liegende Teil des Tropfenfängers ist über eine Länge von 1 cm so weit ausgezogen, bis der innere Durchmesser 2 mm beträgt.

Man bringt z. B. 20 ccm stickstoffhaltiger Lösung (verdünntes Serum) in das Glasgefäß, fügt 5 g Ferrum Hydrogenio reductum hinzu und dann 10 ccm verdünnte Schwefelsäure, welche aus einem Volumen konzentrierter Säure + zwei Volumen Wasser bereitet ist. Dann wird der Gummistopfen mit Tropfenfänger auf das Gefäß angebracht und das Gemisch auf einer kleinen Flamme ungefähr fünf Minuten erhitzt. Es findet bald eine heftige Gasentwicklung statt, die, nachdem die Flamme entfernt worden ist, ruhiger wird. Dann kocht man aufs neue fünf Minuten, womit dann die Reaktion als beendet betrachtet werden darf, d. h. der Wasserstoff hat das vorhandene N in NH_3 übergeführt und dieser verbindet sich unmittelbar mit dem H_2SO_4. Das Übermaß des sich entwickelnden Wasserstoffes findet durch den Tropfenfängen einen Ausweg, und letzterer gibt, bevor er aus dem Apparat entweichen kann, dem darin vorhandenen Wasser die mitgeführten Flüssigkeitsteilchen ab. Später, wenn die Reduktion beendigt ist, spült man dann auch die im Tropfenfänger vorhandene Flüssigkeit sorgfältig aus und setzt dieselbe der Flüssigkeit im großen Glasgefäße zu.

Jetzt sind wir zur zweiten Phase der Methode gelangt, nämlich zur Überführung des Ammoniumsulfats in Ammoniak, Destillation des Ammoniaks und Titration dieser Base. Der saure Inhalt des Gefäßes wird mit 100 ccm Wasser und 30 ccm Kalilauge von 1,25 SG versetzt und dann unmittelbar auf die gebräuchliche Weise (d. h. mittels eines mit dem Tropfenfänger verbundenen Kühlers) abdestilliert. Der Kolben, in welchem das Ammoniak aufgefangen wird, enthält 15 ccm $^1/_{10}$ normale Schwefelsäure.

Das Destillieren wird fortgesetzt, bis ein Drittel der Flüssigkeit aus dem großen Glaskolben verschwunden ist. Das Destillat wird mit $^1/_{10}$ normal verdünnter Schwefelsäure titriert.

Chlor-Bestimmung.

Nachdem aus 10 ccm Flüssigkeit (Serum oder Ödem) nach einer der genannten Methoden das Eiweiß entfernt worden war, wurden 10 ccm $AgNO_3$ $^1/_{10}$ normal und 5 ccm konzentrierter HNO_3 zugesetzt, und nachdem das gebildete AgCl durch Filtration entfernt war, im Filtrat das Übermaß von $AgNO_3$ bestimmt, mittels KCNS, HNO_3 und Eisenalaun.

II. Einfluß des Druckes der subkutan eingespritzten Flüssigkeit auf die Stromgeschwindigkeit des Blutes.

Wie gesagt, erhoben wir bereits früher Zweifel über die Richtigkeit von Starlings Schlußfolgerung aus dessen Versuchen, nach denen bei Steigerung des Ödemdrucks der Abfluß des venösen

Blutes abnimmt. Wir haben deshalb jetzt seine betreffenden Experimente wiederholt und zwar mit der Abänderung, daß das künstliche Ödem nicht wie bei Starling lediglich auf den großen Venenstamm drückte sondern auf das entsprechende Kapillargebiet, es wurde dies dadurch erzielt, daß die Injektion um die Metatarsi stattfand. Weiter wurden die Versuche nicht an einem Bein ausgeführt mit abwechselndem Druck, sondern an zwei mit verschiedenem Druck und drittens war auch der hydrostatische Druck des Ödems geringer als bei Starlings Versuchen. Die folgende Tabelle (Seite 371) enthält die Resultate einer Versuchsreihe. Die Einrichtung bedarf wohl keiner näheren Erklärung.

Wie aus der Tabelle hevorgeht, war um 12.04 $^1/_2$ Uhr rechts und links die Geschwindigkeit des Blutstromes gleich. Nun wurden die Nadeln, mittels welcher die isotonische Salzlösung unter die Haut eingespritzt wurde, an der Innen- und Außenfläche des Metatarsus ein wenig oberhalb des Metatarseo-phalangealgelenkes in das Unterhautbindegewebe eingeführt und mit der Druckflasche verbunden. Nach einiger Zeit bildete sich im Unterhautbindegewebe der beiden Beine ein Ödem, das sich um den Metatarsus und teilweise über das Metatarseo-phalangealgelenk ausdehnte. Das Blut wurde jetzt wieder durchgeführt.

Man sieht deutlich (R. II und L. II), daß die Geschwindigkeit des Blutstromes durch das linke Bein bedeutend geringer ist als rechts, wo der Druck in dem Unterhautbindegewebe 100 mm schwächer ist.

Vergleicht man R. II mit L. III, so ergibt sich, daß die Durchschnittsgeschwindigkeit bei 50 mm Druck im rechten und linken Beine gleich ist.

Die durchschnittlich herausgeflossene Menge Blut (vergl. R. III bei 0 mm Druck) ist bedeutend größer als bei 50 mm Druck (vergl. R. II und R. IV). In R. IV ist die Stromgeschwindigkeit größer als unter demselben Druck bei 50 mm unter R. II. Das muß seinen Grund darin haben, daß unter R. II noch nicht die volle Stromgeschwindigkeit erreicht ist.

Links nimmt die Geschwindigkeit bei Abnahme des subkutanen Druckes (L. III) ebenfalls zu. Bei 150 mm (L. IV) sinkt die Geschwindigkeit wieder, allein die durchschnittliche Blutmenge, welche bei 150 mm Druck unter L. II ausgeflossen ist, ist viel geringer als bei demselben Drucke unter L. IV. Auch hier glaube

Rechts				Links			
Zeit	Anzahl Minuten	Druck Ödem in mm Flüssigkeit	Menge ausgeflossenen Blutes	Zeit	Anzahl Minuten	Druck Ödem in mm Flüssigkeit	Menge ausgeflossenen Blutes
11,50 — 11,55	5		250	11,50 — 11,55^5	5,5		250
11,55 — 12,00	5		250	11,55^5— 12,00	4,5		250
12,00 — 12,04^5	4,5		250	12,00 — 12,04^5	4,5		250
II.				II.			
12,30 — 12,33	3	50	250	12,30 — 12,34^5	4,5	150	250
12,33 — 12,39	3		250	12,34^5— 12,39	4,5		250
12,39 — 12,41^5	2,5		250	12,39 — 12,44	5		250
12,41^5— 12,44^5	3		250				
12,44^5— 12,47^5	3		250	12,44 — 12,48	4		250
12,47^5— 12,50	2,5		250	12,48 — 12,51	3	↓	250
12,50 — 12,52^5	2,5		250	III.			
1,01^5— 1,03	1,5		250	1,01^5— 1,04	2,5	50	250
1,03 — 1,05	2		250	1,04 — 1,06^1	2,1		250
1,05 — 1,07	2		250				
1,07 — 1,09	2		250	1,06^1— 1,08^8	2,7		250
1,09 — 1,11	2		250	1,08^8— 1,11	2,2		250
1,11 — 1,13	2	↓	250	1,11 — 1,13^6	2,6		250
III.							
1,13 — 1,14^6	1,6	0	250	1,13^6— 1,15^9	2,3		250
1,14^6— 1,16^5	1,9		250	1,15^9— 1,18	2,1		250
1,16^5— 1,18^2	1,7		250				
1,18^2— 1,20	1,8		250	1,18 — 1,20	2		250
1,40 — 1,41^9	1,9		250				
1,41^9— 1,43^6	1,7		250	1,40 — 1,42^6	2,6		250
1,43^6— 1,45	1,5	↓	250	1,42^6— 1,44^9	2,3	↓	250
IV.				IV.			
1,56 — 1,58	2	50	250	1,56 — 1,58^5	2,5	150	250
1,58 — 1,59	1		250	1,58^5— 2,01	2,5		250
1,59 — 2,01	2		250				
2,01 — 2,02^5	1,5		200	2,01 — 2,02^5	1,5		200
2,02^5— 2,04^5	2		200	2,02^5— 2,05	2,5		200
2,04^5— 2,06	1,5		200	2,05 — 2,06^5	1,5		200
2,06 — 2,07^5	1,5		200	2,06^5— 2,09	2,5		200
2,15 — 2,16^5	1,5		200	2,15 — 2,17^5	2,5		200
2,16^5— 2,18	1,5		200				
2,18 — 2,19^5	1,5	↓	200				
				2,30 — 2,32^5	2,5		200
				2,32^5— 2,35	2,5		150
				2,35 — 2,36^5	1,5		150
				2,36^5— 2,38	1,5	↓	150

ich, ebenso wie bei R. II, darauf aufmerksam machen zu müssen, daß unter L. II die volle Stromgeschwindigkeit noch nicht erreicht war.

Aus diesem Versuch ergibt sich also, daß schon bei geringer Erhöhung des Druckes im Unterhautbindegewebe die Blutstromgeschwindigkeit abnimmt.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung der in der vorigen Tabelle verzeichneten Resultate.

Rechts			Links		
	Druck des Ödems in mm Flüssigkeit	Menge des ausgeflossenen Blutes in 5 Minuten (durchschnittlich) ccm		Druck des Ödems in mm Flüssigkeit	Menge des ausgeflossenen Blutes in 5 Minuten (durchschnittlich) ccm
I.	—	256	I.	—	256
II.	50	514,5	II.	150	297,5
III.	0	723	III.	50	530
IV.	50	670	IV.	150	464

Dieser Versuch bestätigt somit die Beobachtung Starlings, daß nämlich bei steigendem Drucke im Unterhautbindegewebe die Geschwindigkeit des venösen Blutstromes abnimmt, und erweitert die Beobachtung des Verfassers noch in dem Sinne, daß genannter Einfluß sich bereits bei sehr geringer Drucksteigerung und auch bei Applikation des Ödems in der resorbierenden Gegend selbst, geltend macht.

III. Einfluß, den der Druck des künstlichen Ödems auf den Übergang von dessen Bestandteilen in das vorüberströmende Blut ausübt.

Nachdem durch die oben beschriebenen Versuche festgestellt war, daß bereits eine geringfügige Steigerung des Ödemdruckes Verringerung des venösen Blutstromes herbeiführt, sollte jetzt untersucht werden, ob, wie Starling annahm, mit dieser Verringerung eine Abnahme der Resorption einherging.

Zu diesem Zwecke wurde in das subkutane Bindegewebe des einen Beines ein Gemisch von mit der Blutflüssigkeit isotonischen Salzlösungen unter einem Drucke von 50 mm eingespritzt; in das

subkutane Bindegewebe des anderen Beines dieselbe Salzlösung unter einem Drucke von 150 mm. Dann wurde durch jedes Bein 750 ccm Blut mehrmals durchgeführt, und nachher durch chemische Untersuchung der beiden Blutsera quantitativ festgestellt, inwieweit die Salze in verschiedener Menge aus der Lösung von dem Blute aufgenommen worden waren.

Versuch II.

In dem jetzt folgenden Versuche wurde durch jedes Bein in einer Stunde und 40 Minuten neunmal 750 ccm defibriniertes Blut geführt. Die hier für das Ödem benutzte Flüssigkeit bestand aus einem Teil isotonischer Natriumjodidlösung und einem Teil isotonischer Natriumnitratlösung. Wie gesagt, war der Druck unter der Haut rechts 100 mm, links 150 mm.

Versuch	Druck des Ödems mm	Feste Bestandteile in 10 ccm Serum g	N-Gehalt in 10 ccm Serum mg
Das ursprüngliche Blut (das also nicht durch das Bein geführt wurde)	—	0,781	21
Versuch am rechten Beine .	100	0,926	25,2
Versuch am linken Beine . .	150	0,895	28,1

Zunächst geht aus der Tabelle hervor, daß bei der Durchführung des Blutes durch die Beine der Gehalt des Serums an festen Bestandteilen zugenommen hat, die am rechten Bein 18,5 %, am linken 14,59 %.

Diese Zunahme der festen Bestandteile kann wohl nicht anders als der Wasserverdunstung beim wiederholten Übergießen des Blutes zugeschrieben werden. Weiter erhellt aus der Tabelle, daß während der Durchströmung der Stickstoffgehalt des Serums sich vermehrt hat.

Zu dem Stickstoff des ursprünglichen Serums, welcher wohl fast ausschließlich von Eiweiß stammt, und 21 mg pro 10 ccm Serum beträgt, sind am rechten Bein 20 % und am linken 33,3 % Stickstoff hinzugekommen. Hätte bei der Durchleitung des Blutes kein Stickstoff das Ödem verlassen, so müßte, der soeben konsta-

tierten Einengung entsprechend, am rechten Bein auch der Stickstoffgehalt um 18,5 % und am linken um 14,59 % größer geworden sein.

Doch was ergab das Experiment?

Die Zunahme des Stickstoffgehaltes in 10 ccm Serum Blut aus dem rechten Beine = 20 %.

Die Zunahme des Stickstoffgehaltes in 10 ccm Serum Blut aus dem linken Beine = 33,3 %.

Hieraus folgt, daß sowohl bei 100 wie bei 150 mm Druck NO_3 in die Blutflüssigkeit übergegangen ist, und zwar bei 150 bedeutend mehr als bei 100 mm. Jodium konnte im Serum nicht nachgewiesen werden. Bei Kontrollexperimenten, in denen dem Serum eine gewisse Menge Natriumjodid zugesetzt worden war, wurde Jodium bis auf wenigstens $^1/_{1000}$ nachgewiesen.

Versuch III.

In diesem Versuch wurde als Ödemflüssigkeit eine Mischung benutzt, welche aus einem Teil isotonischer Chlornatriumlösung und einem Teil isotonischer Natriumnitratlösung bestand.

Der Druck des Ödems war rechts 50, links 150 mm. Das Blut strömte 10 mal durch beide Beine.

Versuch	Druck des Ödems mm	Feste Bestandteile in 10 ccm Serum g	N-Gehalt in 10 ccm Serum mg	Cl-Gehalt mg
Das ursprüngliche Blut (das also nicht durch das Bein geführt wurde)	—	0,859	30	33,68
Versuch am rechten Bein .	50	0,902	31,16	34,03
Versuch am linken Bein . .	150	0,900	32,2	34,88

Die Zunahme der festen Bestandteile des Serums am rechten Beine = **4,8** %, am linken Beine = **4,4** %.

Offenbar war infolge besserer Schließung des Reservoirs die Verdunstung des Wassers viel geringer als beim vorigen Versuch.

Die Zunahme des N-Gehaltes am rechten Beine = 2,8 %.

Die Zunahme des N-Gehaltes am linken Beine = 5,5 %.

Wenn N-haltige Stoffe weder in das Serum eingetreten noch ausgetreten wären, so hätte infolge der Wasserverdunstung die Zunahme des N-Gehaltes im Serum des rechten Beines 4,4% und im Serum des linken Beines 5,5% betragen müssen. In Wahrheit ist die Zunahme beim Versuch am rechten Bein (50 mm Druck) geringer.

Bei einem Druck von 50 mm muß also etwas Eiweiß in die Ödemflüssigkeit übergangen sein. Unter einem Drucke von 150 mm dagegen ist NO_3 in das Serum hinübergetreten.

Die Zunahme des Cl-Gehaltes in 10 ccm Blutserum aus dem rechten Beine = **1,3%**.

Die Zunahme des Cl-Gehaltes in 10 ccm Blutserum aus dem linken Beine = **3,3%**.

Bezugnehmend auf den Einfluß der Wasserverdunstung auf die Konzentration der Serumbestandteile, darf man sagen, daß Chlor aus dem Serum in die Ödemflüssigkeit übergegangen ist, und zwar bei höherem Drucke weniger als bei niederem.

Versuch IV.

Wiederholung des vorigen Experimentes. Die Versuchsanordnung ist genau dieselbe. Das Blut strömte sechsmal durch beide Beine.

Versuch	Druck des Ödems mm	Feste Bestandteile in 10 ccm Serum g	N-Gehalt in 10 ccm Serum mg	Chlorgehalt mg
Das ursprüngliche Blut (das also nicht durch das Bein geführt wurde) .	—	0,96	28,2	34,03
Versuch am rechten Bein	60	1,02	29,4	34,03
Versuch am linken Bein	150	1,00	29,7	34,03

Die Zunahme der festen Bestandteile im Serum des aus dem rechten Beine fließenden Blutes **6%**.

Die Zunahme fester Bestandteile im Serum des aus dem linken Beine fließenden Blutes = **4%**.

Die Zunahme des N-Gehaltes im Serum des aus dem rechten Beine fließenden Blutes = **4%**.

Die Zunahme des N-Gehaltes im Serum des aus dem linken Bein fließenden Blutes = **5%**.

Die Zunahme des Cl-Gehaltes im Serum des aus dem rechten Beine fließenden Blutes = 0%.

Die Zunahme des Cl-Gehaltes im Serum des aus dem linken Beine fließenden Blutes = 0%.

Wenn kein N oder Cl in die Blutzirkulation gedrungen wäre oder auch die Zirkulation verlassen hätte, so hätten beide im rechten Beine mit 6%, im linken Beine mit 4% zunehmen müssen. Doch was ist tatsächlich der Fall? Die Blutflüssigkeit des rechten Beines (60 mm Ödemdruck) ist nur 4% im N-Gehalte gestiegen. Es muß also Eiweiß an die Ödemflüssigkeit abgegeben worden sein. Dagegen ist der N-Gehalt beim Versuch am linken Beine 5% gestiegen. Hieraus geht hervor, daß bei einem Ödemdruck von 150 mm, NO_3 in das Blut hinübergetreten ist. Letzteres kann auch wohl der Fall gewesen sein bei einem Ödemdruck von 60 mm. Aber in diesem Fall ist dann der dem Übertritt von Eiweiß entsprechende N-Verlust des Serums durch den Eintritt von NO_3 in die Blutbahn nicht kompensiert worden.

Da der Chlorgehalt weder zu- noch abnahm. so ergibt sich, daß die Blutflüssigkeit des rechten Beines 6%, die des linken Beines 4% Chlor an das Ödem abgegeben hat.

Auch hier ersieht man wieder, daß der höhere Druck im interstitiellen Bindegewebe einen unmittelbaren Einfluß auf den Übergang des Chlors ausgeübt hat, und zwar in entgegengesetztem Sinne wie auf den des NO_3.

Man fragt sich, was wohl der Grund dieses Gegensatzes zwischen dem Verhalten von NO_3 und Cl sein mag.

Die Tatsache, daß trotz des vom Ödem ausgeübten Gegendruckes, doch Cl aus den Blutgefäßen in dasselbe hinübergeht, leitet den Gedanken auf Untersuchungen von Achard und Gaillard[1]). Diese Forscher spritzten Natriumsulfat, -Traubenzucker, -Rohrzucker- und Ureumlösungen in die Bauchhöhle von Kaninchen, und beobachteten, daß der Chlorgehalt der eingespritzten Flüssigkeit zunahm, je nachdem das andere Salz resorbiert wurde. Auch wenn sie der eingespritzten Flüssigkeit Chlornatrium zusetzten, fand noch ein Zufluß von Chlor in die Bauchhöhle und eine „Retention“ daselbst statt.

---

[1]) Achard und Gaillard, Arch. de médecine expérimentale **14**, 41. 1904.

Gleiches geschieht nach der Mitteilung von Nobécourt und Vitry[1]) im Dünndarme des Kaninchens.

Es fragt sich also jetzt: würde solch eine „Chlorretention" auch im Unterhautbindegewebe stattfinden?

Für das Unterhautbindegewebe aber wurde diese Angelegenheit bis jetzt noch nicht untersucht. Man braucht sich darüber nicht zu wundern, denn mit Hinsicht auf die hier für die Untersuchung erforderlichen größeren Flüssigkeitsmengen sind die üblichen Laboratoriumsversuchstiere zu klein. Zum betreffenden Zweck braucht man große Haustiere. Hier wurde das Pferd benutzt.

IV. Das quantitative Verhalten von Chlor bei subkutanen Injektionen.

Das Verfahren bestand darin, daß unter die Haut des Pferdes 200 bis 300 ccm erst auf 100° erhitzte und auf Körpertemperatur abgekühlte Salzlösung gespritzt, und was von derselben nach einer Stunde übrig geblieben war, möglichst entfernt wurde.

Wie aus den hier unten folgenden Mitteilungen ersichtlich, wurde für den ersten Versuch die Schultergegend gewählt; später wurde die Vorderbrustgegend vorgezogen, weil die Haut da locker liegt und das Ödem sich nur in einer Richtung, d. h. in caudaler, ausbreiten kann.

Die Nadel, welche zur Injektion diente, blieb während der ganzen Versuchszeit unter der Haut liegen. Natürlich wurde dafür gesorgt, daß keine Flüssigkeit durch dieselbe abtröpfelte. Es wurde das in einfacher Weise erzielt durch Anbringen eines Gummiröhrchens, das abgeklemmt wurde. Wollte man die Flüssigkeit entfernen, so wurde die Klemme abgenommen.

Versuch V.

Pferd $\pm$ 16 Jahr alt. In das Unterhautbindegewebe der rechten Schultergegend wurde 300 ccm einer Mischung von 1 Teil NaCl 0,9 % + 1 Teil $NaNO_3$ 1,03 % Lösung eingespritzt.

Nach einer Stunde hat sich die Flüssigkeit über einer Oberfläche von $\pm$ 20 cm der Schultergegend verbreitet.

[1]) Modification de l'eau distillée et de solutions chlorurées sodiques dans l'intestin grêle du lapin. Journ. de physiol. et de pathol. génér. **1904**, Nr. 4.

Die entfernte Flüssigkeit war ein wenig trübe; am nächsten Morgen hatten sich die Blutkörperchen zu Boden gesenkt und war die Flüssigkeit vollständig klar. Doch enthielt sie ein wenig Eiweiß. Es wurde dies behufs der Analyse entfernt. Das Eiweiß stammte offenbar von den Blutspuren, deren Blutkörperchen die Trübung herbeigeführt hatten. Übrigens wird auch wohl etwas Eiweiß von der Lymphe stammen.

Schon früher bei der Erforschung der Resorption in der Bauchhöhle fand ich ähnliches. Es hieß da: von 150 ccm NaCl-Lösung welche in die Bauchhöhle gespritzt wurden, waren nach einer Stunde 38 ccm fast vollkommen klar gebliebene Flüssigkeit noch vorhanden, welche nach einigen Stunden ein Gerinnsel ausschied[1]).

Die chemische Analyse ergab folgendes:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit .	35,55	30,89
10 ccm Ödemflüssigkeit	Durch Zerspringen des Kühlfasses ist die Nitratbestimmung verloren gegangen	39,00

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß der Chlorgehalt der Ödemflüssigkeit gestiegen ist. Die Zunahme beträgt 26 %. Auch das elektrische Leitvermögen war gestiegen, aber nur um 7 %, Daß dieser Betrag im Vergleich mit der 26 %igen Zunahme des Chlorgehaltes so klein ist, kann nur daran zugeschrieben werden, daß $NaNO_3$ aus der Ödemflüssigkeit verschwunden ist.

Versuch VI.

Pferd ± 10 Jahr alt, zwar mager, aber sonst in gesundem Zustande. In das Unterhautbindegewebe der Vorderbrustgegend wurde 225 ccm einer Mischung von 1 Teil NaCl 0,9 % und 1 Teil $NaNO_3$ 1,03 % eingespritzt.

Die Ödemflüssigkeit wird nach einer Stunde entfernt.

---

[1]) Hamburger, Arch. f. (Anat. und) Physiol. **1895**, 294.

Die chemische Analyse ergab folgendes:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit . . .	40,95	24,82
10 ccm Ödemflüssigkeit	37,23	28,36

Also Zunahme des Chlorgehalts in der Ödemflüssigkeit . . . . = **14,3 %**
Abnahme des Nitratgehalts in der Ödemflüssigkeit . . . . = **9 %**

Versuch VII.

Pferd ± 16 Jahre alt. Dieses Pferd hatte eine schmale Vorderbrust, so daß das Einspritzen und Entfernen an dieser Stelle Schwierigkeiten darbot.

Eingespritzt wurden 250 ccm einer Mischung von 175 ccm, NaCl 0,9 % + 175 ccm. $NaNO_3$ 1,03 % + 150 ccm Aqua, also eine hypisotonische Lösung.

Nach einer Stunde wurden erst 10 ccm Ödemflüssigkeit entfernt, welche einigermaßen rot gefärbt war, danach wieder 10 ccm.

Diese letzte Flüssigkeit, welche ganz klar war, wurde für die Bestimmung des elektrischen Leitvermögens und für die chemische Analyse benutzt.

Elektrisches Leitvermögen:

Rheostat	Einstellung der Brücke	Faktor	Widerstand
Eingespritzte Flüssigkeit bei			t = 16° 45 C.
35 Ω	501	1,004	35,14 Ω
Ödemflüssigkeit bei			t = 16° 5 C.
26 Ω	501	1,004	26,1 Ω
Die Temperatur sinkt			t = 16° 60 C.
26,1 Ω	501	1,004	26,2 Ω

Das elektrische Leitvermögen hat also eine Zunahme von **33 %** erfahren.

Chemische Analyse:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit . .	26,867	20,03
10 ccm Ödemflüssigkeit	—	39,91

Zunahme des Chlorgehalts der Ödemflüssigkeit = **49,3 %**.

Versuch VIII.

Pferd ± 14 Jahr alt. Ins Unterhautbindegewebe der Vorderbrust wurden 300 ccm einer Mischung von 175 ccm NaCl 0,9 % + 1,75 $NaNO_3$ + 150 ccm Aqua eingespritzt.

Nach einer Stunde wurden 30 ccm Flüssigkeit entfernt. Die Flüssigkeit war klar, etwas gelblich gefärbt.

Elektrisches Leitvermögen:

Eingespritzte Flüssigkeit bei . . . . t = 14° 65 C.

Rheostat	Einstellung der Brücke	Faktor	Widerstand
37 Ω	502	1,008	37,3 Ω

Ödemflüssigkeit bei . . . . t = 14° 55 C.

Rheostat	Einstellung der Brücke	Faktor	Widerstand
30 Ω	498,5	0,994	29,44 Ω

Das elektrische Leitvermögen hat also eine Zunahme von 25 % erfahren.

Gefrierpunktserniedrigung:

Eingespritzte Flüssigkeit . . . △ = — 0,308°
Ödemflüssigkeit . . . . . . △ = — 0,419°
Die durchschnittliche Gefrierpunktserniedrigung des Serums des Pferdes = — 0,560°

Chemische Analyse:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit . . .	30,09	18,47
10 ccm Ödemflüssigkeit	24,82	26,52

Also:

Zunahme des Chlorgehalts der Ödemflüssigkeit = **43,05 %**,
Abnahme des Nitratgehalts der Ödemflüssigkeit = **21,9 %**.

Versuch IX.

Pferd ± 14 Jahre alt. Injiziert wurden in das Unterhautbindegewebe der Vorderbrustgegend ± 225 ccm einer Lösung von 1,03 % $NaNO_3$ (isotonisch mit dem Blutserum).

Nach einer Stunde wurde ungefähr 20 ccm klare Flüssigkeit entfernt.

Elektrisches Leitvermögen:

Eingespritzte Flüssigkeit bei . . . . t = 14,4° C.

Rheostat	Einstellung der Brücke	Faktor	Widerstand
31 Ω	498	0,992	30,75 Ω

Ödemflüssigkeit bei . . . . t = 14° 15 C.

Rheostat	Einstellung der Brücke	Faktor	Widerstand
28 Ω	504	1,016	28,45 Ω

Also Zunahme des elektrischen Leitvermögens um **8,6 %**.

Die chemische Analyse ergab:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit . . .	67,94	—
10 ccm Ödemflüssigkeit	57,95	26,6

Zunahme des Chlorgehalts der Ödemflüssigkeit = **26,6 %**.
Abnahme des Nitratgehalts der Ödemflüssigkeit = **14,7 %**.

Wenn wir nun die Resultate des V., VI., VII., VIII. und IX. Versuches in einer Tabelle zusammenstellen, so sehen wir, daß in allen Fällen eine Resorption von $NaNO_3$ und eine Zunahme von Chlor in der Ödemflüssigkeit stattfindet.

Eingespritzte Flüssigkeit:

Vor dem Aufenthalt im Unterhautbindegewebe			Nach dem Aufenthalt im Unterhautbindegewebe			
Versuch Nr.	Chlorgehalt mg	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg	Nitratgehalt mg	Zunahme von Chlor %	Abnahme von Nitrat %
V	30,89	35,55	39,00	—	26	—
VI	24,82	40,95	28,36	37,23	14	9
VII	20,03	26,86	31,91	—	59	—
VIII	18,47	30,09	26,52	24,82	43,5	21,9
IX	0	67,94	26,6	57,95	26,6	14,7

In allen 5 Versuchen ist also Chlor in das Ödem hinübergewandert. Auch das Unterhautbindegewebe scheint also das von Achard und Gaillard[1]) und von Nobécourt und Vitry hervorgehobene „zurückhaltende Vermögen“ für Chlor zu besitzen.

---

[1]) Achard et Gaillard a. a. O.

Bei näherer Betrachtung stellt sich aber heraus, daß es sich hier nicht um eine eigentümliche, rätselhafte Erscheinung handelt.

Injiziert man ein Gemisch von 1 Teil 1,3 %iger (isotonischer) $NaNO_3$ Lösung, und 1 Teil 0,9 %iger NaCl-Lösung, so spritzt man eigentlich eine Flüssigkeit ein, welche nur 0,45 % NaCl enthält. Da nun die Blutflüssigkeit etwa 0,6 % NaCl enthält, so kann es nicht wundern, daß durch Diffusion NaCl in das künstliche Ödem übertritt.

Wenn diese Auffassung richtig ist, so darf zunächst der Chlorgehalt der Ödemflüssigkeit den des Blutes niemals übersteigen.

Mit Hilfe der gefundenen Zahlen kann untersucht werden, ob das in den vorliegenden Versuchen in der Tat der Fall ist.

Im Versuch V, wo eine Flüssigkeit eingespritzt wurde, die nur 0,45 % NaCl enthielt, ist die Zunahme an NaCl 26 % gewesen. Also enthielt die entfernte Flüssigkeit $0{,}45 \times \frac{126}{100} = \mathbf{0{,}567}$ % NaCl.

Im Versuch VI wurde dieselbe Flüssigkeit injiziert; die Zunahme des Chlorgehaltes betrug 14 %. Die NaCl-Lösung war somit $0{,}45 \times \frac{114}{100} = 0{,}513$ %.

In Versuch VII enthielt die Flüssigkeit nach Entfernung aus dem Unterhautbindegewebe $0{,}315 \times \frac{159}{100} = 0{,}5$ %.

In Versuch VIII war der betreffende Betrag $0{,}315 \times \frac{143{,}5}{100} = 0{,}452$ %, in Versnch IX 0,45 %.

Man sieht, daß der NaCl-Gehalt der Ödemflüssigkeit in keinem der Versuche über 0,6 % hinaussteigt.

Man kann noch eine zweite Anforderung stellen. Wenn die eingespritzte Salzlösung mehr als 0,6 % NaCl enthält, so muß der Chlorgehalt dieser Flüssigkeit abnehmen. In der Tat hat sich das auch herausgestellt.

Es wurden 200 ccm einer 0,9 %igen NaCl-Lösung unter der Brusthaut injiziert. Eine Stunde nachher wurde die Flüssigkeit entfernt. Es zeigte sich nun, daß der Chlorgehalt um **22 %** abgenommen hatte. Der NaCl-Gehalt war also ein $\frac{78}{100} \times 0{,}9 =$ 0,7 %iger geworden.

Es handelt sich also lediglich um einen Diffusionsvorgang. Ist die eingespritzte NaCl-Lösung konzentrierter als die des Blut-

serums, konzentrierter also als 0,6 %, so geht Chlor in das Blut hinüber. Ist der NaCl-Gehalt des künstlichen Ödems kleiner als der des Blutserums, kleiner also als 0,6 %, so tritt NaCl aus der Blutbahn in das Ödem hinüber. Im letzteren Falle eine rätselhafte Chlorretention anzunehmen, ist also überflüssig.

V. Das Verhalten des Chlors bei verschiedenem Ödemdruck.

Zur Untersuchung genannten Verhaltens gab der folgende Versuch Veranlassung. Das Experiment an sich ist auch der Erwähnung wert.

Versuch X.

Pferd, 6 Jahre alt. Von einer Mischung von 1 Volumteil NaCl 0,9 % und $NaNO_3$ 1,03 %, wurde 100 ccm in das Unterhautbindegewebe der äußeren Fläche des rechten Unterarmes und 200 ccm an derselben Stelle des linken Vorderbeines eingespritzt. Die Flüssigkeit wurde unter einem ziemlich hohen Druck, welcher während des Versuches nur wenig abnahm, eingeführt.

Als nach einer halben Stunde Flüssigkeit entfernt werden sollte, konnte rechts nicht genug gesammelt werden. Links wurde jedoch 40 ccm aufgefangen. Diese Flüssigkeit wurde untersucht.

Die chemische Analyse ergab:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit . . .	49,64	30,04
10 ccm Ödemflüssigkeit	46,48	31,91

Also Zunahme des Chlorgehalts der Ödemflüssigkeit = 6 %
und Abnahme des Nitratgehalts der Ödemflüssigkeit = 6,4 %.

Die Ödemflüssigkeit enthielt eine sehr geringe Quantität Eiweiß. Diese wurde aus der Flüssigkeit, welche für die Chloranalyse bestimmt war, nach der ersten der auf S. 368 beschriebenen Methode entfernt, während sie aus der Flüssigkeit, welche für die Nitratanalyse bestimmt war, nach der vierten jener Methoden entfernt wurde.

Vergleicht man die hier konstatierte Zunahme des Chlorgehaltes mit der, welche in den Versuchen der vorigen Serie gefunden wurde, so fällt es auf, daß dieselbe geringfügig ist.

Aus der folgenden Tabelle möge das deutlich hervorgehen.

Reihenfolge des Versuches	Zunahme des Chlorgehaltes %
V	27
VI	14,3
VII	59,3
VIII	43,5
IX	26,6
X	6

Fragt man sich, was wohl die Ursache sein mag, so erscheint die Voraussetzung nicht gewagt, daß der höhere Druck des Ödems im Versuch X verantwortlich zu machen sei.

Um diese Voraussetzung näher zu prüfen, wurde versucht, an zwei symmetrischen Stellen ein Gemisch von gleichen Teilen einer isotonischen NaCl- und $NaNO_3$-Lösung unter verschiedenem Druck einzuspritzen.

Als symmetrische Stelle wurde gewählt der rechte und linke Humeralteil des Musculus pectoralis des Pferdes. Der Druckunterschied wurde erzielt durch Einspritzung ungleicher Volumina des Gemisches.

Versuch XI.

Pferd ± 16 Jahre alt. Von einer Mischung von NaCl 0,9 % und $NaNO_3$ 1,03 % wurde 250 ccm in das Unterhautbindegewebe der linken, 150 ccm in das der rechten Vorderbrust eingespritzt.

Die Ödemflüssigkeit wurde nach 1/4 Stunde entfernt.

Die chemische Analyse ergab:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit . . .	40,95	25,23
10 ccm Ödemflüssigkeit an der linken Seite (bei hohem Druck)	37,23	27,00
10 ccm Ödemflüssigkeit an der rechten Seite (bei niederem Druck)	40,95	28,36

Also: Zunahme des Chlorgehalts bei hohem Druck im subkutanen Bindegewebe = **7** %.

Zunahme des Chlorgehalts bei niederem Druck im subkutanen Bindegewebe = **12,3** %.

Abnahme des Nitratgehalts bei hohem Druck im subkutanen Bindegewebe = **9%**.

Abnahme des Nitratgehalts bei niederem Druck in dem subkutanen Bindegewebe = **0%**.

Versuch XII.

Wiederholung von Versuch XI.

Pferd ± 15 Jahre alt. Von einer Mischung von NaCl 0,9% und $NaNO_3$ 1,03%, wurde 300 ccm in das Unterhautbindegewebe der linken, und 150 ccm in das der rechten Vorderbrust eingespritzt.

Die Ödemflüssigkeit wurde nach 1/2 Stunde entfernt.

Die chemische Analyse ergab:

	Nitratgehalt mg	Chlorgehalt mg
10 ccm eingespritzte Flüssigkeit . . .	33,90	31,20
10 ccm Ödemflüssigkeit (bei hohem Druck)	31,03	33,59
10 ccm Ödemflüssigkeit (bei niederem Druck)	32,02	35,45

Also Zunahme des Chlorgehalts bei hohem Druck im subkutanen Bindegewebe = **7,6%**.

Zunahme des Chlorgehalts bei niederem Druck im subkutanen Bindegewebe = **13,6%**.

Abnahme des Nitratgehalts bei hohem Druck in dem subkutanen Bindegewebe = 8,5%.

Abnahme des Nitratgehalts bei niederem Druck in dem subkutanen Bindegewebe = 5,5%.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß durch Steigerung des Ödemdruckes der Übergang von Chlor aus den Blutgefäßen gehemmt wird, der von NO_3 dagegen befördert.

Dieses Resultat stimmt vollkommen mit dem auf ganz anderen Wege bei Kälbern gewonnenen überein.

VI. Deutung der gefundenen Tatsachen.

Um die gefundenen Tatsachen zu deuten, denke man sich einen Augenblick, daß die Gewebeflüssigkeit ersetzt wird von einer mit derselben isotonischen $NaNO_3$-Lösung, welche unter demselben Drucke steht, wie die ursprüngliche Gewebeflüssigkeit.

Es wird dann ein Austausch von Bestandteilen stattfinden, u. a. wird infolge Diffusion $NaNO_3$ in die Blutbahn hinübertreten, und umgekehrt NaCl die Blutbahn verlassen. Steigert man nun den interstitiellen Druck, so gesellt sich zu der Diffusion auch eine Filtration. Hierdurch wird der Übertritt der $NaNO_3$-Lösung in die Blutbahn beschleunigt und der entgegengesetzte Übertritt von NaCl in die künstliche Gewebeflüssigkeit beschränkt. Diese Erscheinungen werden umso stärker zum Ausdruck kommen, je nachdem man den Druck der interstitiellen Flüssigkeit (künstlichen Ödems) erhöht.

Nimmt man als künstliche Gewebeflüssigkeit statt einer reinen $NaNO_3$-Lösung ein Gemisch von gleichen Volumina solch einer $NaNO_3$-Lösung und einer 0,9 %igen NaCl-Solution, so ist das Resultat im qualitativen Sinne das nämliche. Denn auch jetzt geht $NaNO_3$ in die Blutbahn hinüber und tritt NaCl aus; das Blutplasma enthält ja 0,6 % NaCl, während im künstlichen Ödem nur 0,45 % vorkommt.

Es gibt also auch keinen Grund, warum auch hier eine Drucksteigerung des künstlichen Ödems nicht eine Beschleunigung des Übertritts von NO_3 in die Blutbahn und eine Verlangsamung des Übergangs von NaCl in die Gewebeflüssigkeit herbeiführen soll.

Es liegt auf der Hand, daß diese Erscheinungen sowohl bei schnellem wie bei langsamem Blutstrom stattfinden werden. Demnach läßt es sich denn auch sehr gut verstehen, daß, wenn mit der Drucksteigerung des künstlichen Ödems eine Verlangsamung des Blutstromes einhergeht — was tatsächlich der Fall ist —, diese Verlangsamung eine Resorption nicht auszuschließen braucht. Nur wird die Verlangsamung des Blutstromes so bedeutend sein können, daß die sonstige durch stärkere Durchpressung durch die Kapillarwand herbeigeführte Resorptionszunahme nicht mehr zum Ausdruck kommt, ja es wird sogar dahin kommen können, daß die Zunahme in eine Abnahme übergeht. Es handelt sich dann um einen Zustand, den wir früher bei der Resorption in

der Bauchhöhle experimentell nachgewiesen und theoretisch erklärt haben. Steigert man den intraabdominalen Druck ein wenig, so nimmt erst die Größe der Flüssigkeitsresorption zu, fährt man mit der Steigerung fort, so erreicht sie ihren Höhepunkt und nimmt dann bei noch weiterer Steigerung ab.

Wir hätten auch bei der Resorption im Unterhautgewebe diesen Kehrpunkt gern experimentell festgestellt, haben jedoch vorläufig darauf verzichtet. Mit den Versuchen sind große Schwierigkeiten verknüpft, die Möglichkeit des Mißlingens eines Experimentes ist nicht gering. Außerdem sind dieselben kostspielig, weil man zu diesem Zweck größere Tiere braucht.

Wir haben uns also hier mit dem experimentellen Nachweis begnügt, *daß, im Gegensatz zu der Ansicht Starlings, durch Drucksteigerung der Ödemflüssigkeit die Aufnahme von Ödembestandteilen in die Blutbahn befördert und der Austritt von Serumbestandteilen beschränkt wird, und zwar durch eine Druckzunahme, die eine Verlangsamung des Blutstromes herbeiführt.*

Diese Untersuchungen liefern wieder neue Argumente für den Satz, daß das Gleichgewicht zwischen Blut- und Gewebeflüssigkeit durch Diffusion, Filtration und osmotischen Druck beherrscht wird.

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Vorstehende Untersuchung hat in der Hauptsache folgende Ergebnisse aufgeliefert:

1. Wenn in das Unterhautbindegewebe eine Flüssigkeit eingespritzt wird, welche besteht aus einer Mischung gleicher Volumina einer dem Blute isotonischen NaCl- und $NaNO_3$-Lösung, so stellt sich heraus, daß bei Steigerung des Injektionsdruckes die Geschwindigkeit des Blutstromes sich verringert.

Dieses stimmt überein mit dem, was Starling schon früher unter etwas anderen Versuchsbedingungen konstatiert hat.

2. Bringt man genanntes Gemisch von Salzlösungen in das Unterhautgebinde, so wird NO_3 daraus resorbiert, der NaCl-Gehalt dagegen nimmt zu. Eine ähnliche Erscheinung betreffs des NaCl beobachteten Achard und Gaillard bei der Resorption in der Bauchhöhle und Nobécourt und Vitry bei der Resorption im

Darm und führen dieselbe auf eine nicht näher erklärte Anziehung der Gewebe zu Chlor, auf eine „Chlorretention" zurück.

Die Erscheinung läßt sich aber auf einfache und ungezwungene Weise dadurch deuten, daß die Konzentration des NaCl im Blutserum 0,6 % beträgt und daß, wenn die zu resorbierende Flüssigkeit gar kein NaCl, oder NaCl in geringerer Konzentration als 0,6 % enthält, ein Teil dieses Salzes durch Diffusion die Blutbahn verläßt, bis Gleichgewicht entstanden ist.

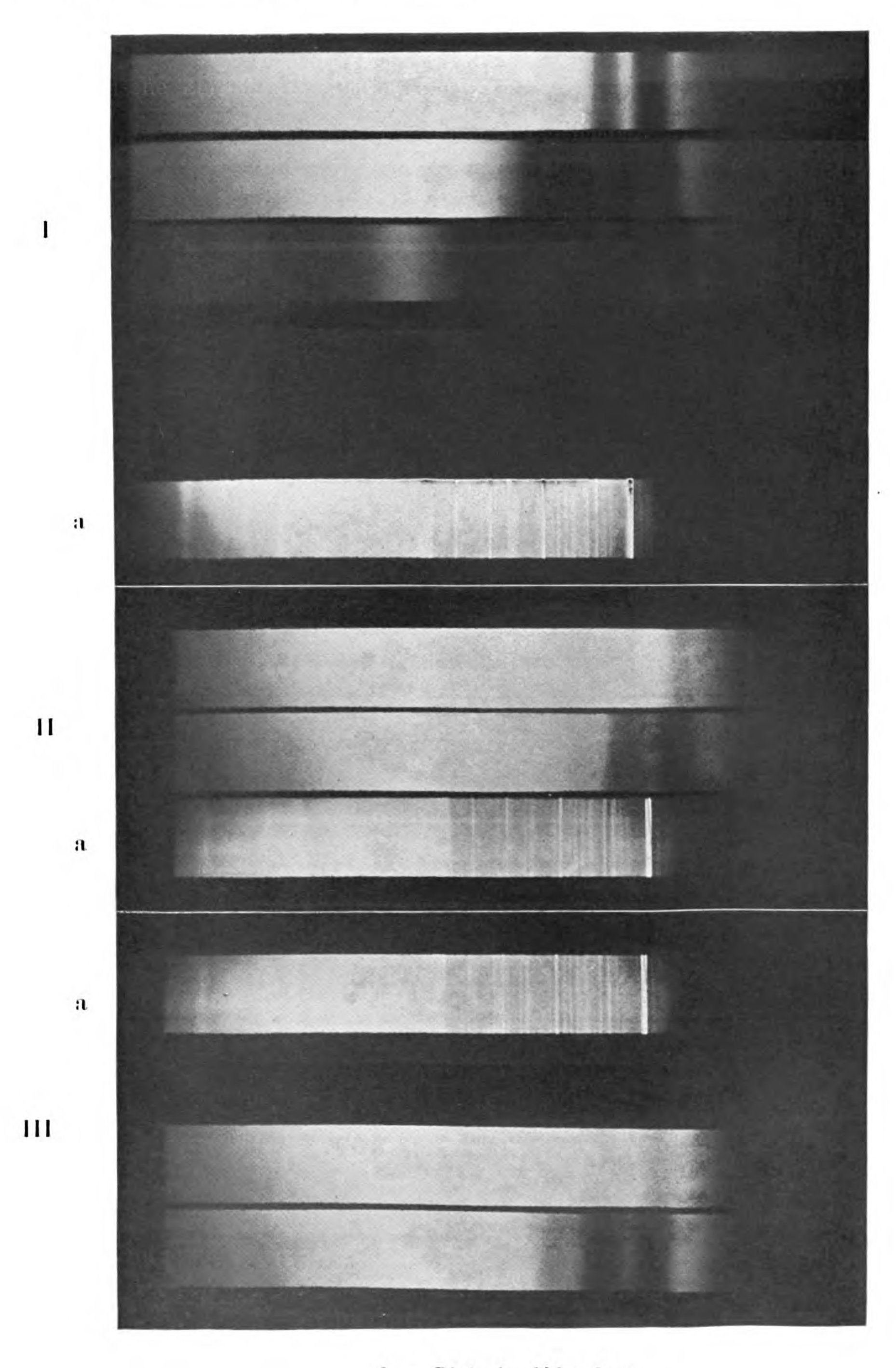
Da das von uns eingespritzte Gemisch nur 0,45 % NaCl enthielt, leuchtet es ein, daß aus der Blutbahn NaCl in das Gemisch hinübertrat.

3. Bei Steigerung des Injektionsdruckes wird, trotz Verlangsamung des Blutstromes die Resorption von NO_3 in die Blutbahn befördert und der Austritt von NaCl gehemmt.

Diese Resultate sind wieder neue Argumente für die Vorstellung, daß auch bei der Resorption im Unterhautbindegewebe physikalische Faktoren (Diffusion, Filtration und osmotischer Druck) die Hauptrolle spielen.

Berichtigung.

In der Arbeit von Dr. Horner: „Zum Verhalten des Phytins im Organismus" (diese Zeitschrift **2**, 428) ist bedauerlicherweise der Vorname des Autors falsch angegeben. Derselbe muß „**Arthur**" lauten, statt „**Oskar**".



I = Bixin in Chloroform.
II = Bixin in Chloroform.
III = Bixin in Alkohol.
a = Wasserstofflinien.

Zur Kenntnis der Eiweißverdauung.

Von

W. Grimmer.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung der Kgl. Sächs. Tierärztlichen Hochschule in Dresden. Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Ellenberger.)

(Eingegangen am 15. Januar 1907.)

In einem früheren Artikel[1]) habe ich die von mir gewonnenen Resultate über den Abbau von pflanzlichem Nahrungseiweiß im Magen und Dünndarm des Pferdes — eines Herbivoren — niedergelegt, die von den beim Hunde mit Fleischfütterung gewonnenen anderer Autoren in vielen Punkten erheblich abwichen. Im Auftrage des Herrn Geheimrat Ellenberger habe ich das Studium der Verdauung von Pflanzeneiweiß auch auf Hunde ausgedehnt, da es besonders interessant erschien, Vergleiche zwischen der Verdauung verschiedener Tierarten — Herbivoren und Carnivoren — bei möglichst ähnlichem Futter anzustellen. Außer einigen anderen Arbeiten[2]), die die Verdauung des Hundes bei Fleisch- oder reiner Eiweißfütterung zu studieren den Zweck haben, ist in neuerer Zeit eine Publikation von London und Polowzowa[3]) erschienen, die ebenfalls die Verdauung pflanzlicher Nahrung beim Hunde beleuchtet. Diese Autoren verfütterten an Fistelhunde Weißbrot und entleerten nach bestimmten Zeiten den Speisebrei aus einer

---

[1]) Diese Zeitschrift **2**, 118.

[2]) Abderhalden, Kautzsch und London, Studien über die normale Verdauung der Eiweißkörper im Magen-Darmkanal des Hundes. Ztschr. f. physiol. Chem. **48**, 549. — Lang, Über Eiweißverdauung und Eiweißresorption im Magen des Hundes. Diese Zeitschrift **2**, 225.

[3]) London und Polowzowa, Zum Chemismus der Verdauung im tierischen Körper VI. Ztschr. f. physiol. Chem. **49**, 328.

Fistel, die bei verschiedenen Hunden eine verschiedene Lage hatte. Auf diese Weise konnten sie die Verdauung der einzelnen Nährstoffe in den einzelnen Abschnitten des Verdauungskanals feststellen bez. berechnen. Sie kommen zu dem wesentlichen Schlusse, daß die Eiweißverdauung im Magen und Dünndarm des Hundes, und parallel damit die Resorption bei Brotnahrung absolut wie relativ viel intensiver verläuft als bei Hühnereiweißnahrung und führen diesen Umstand wohl nicht mit Unrecht darauf zurück, daß durch die poröse Beschaffenheit des Brotes eine viel größere Angriffsoberfläche für die Verdauungssäfte gegeben ist als bei kompakten Eiweißstücken, in welche diese nur langsam und schwer einzudringen vermögen.

Die von mir angestellten Versuche wurden mit Reis ausgeführt, weil dieser ein dem Hunde geläufiges Nahrungsmittel ist und unter den durch Zähmung und Haltung des Hundes gegebenen Verhältnissen einen öfteren Bestandteil seiner Nahrung bildet, andererseits aber auch deshalb, weil in unserem Institute bereits früher eine Versuchsreihe mit Hunden bei Reisfütterung zum Studium der Kohlehydratverdauung angestellt wurde[1]), wobei konstatiert wurde, daß Hunde Reis gut und relativ rasch verdauen, und endlich weil der Reis dem Hafer, mit welchem ich meine Versuche bei Pferden ausgeführt hatte, in seiner chemischen Zusammensetzung ziemlich nahe kommt. Zur Verwendung kamen 8 Hunde, im Gewichte von 25 bis 30 kg, von denen je zwei 1, 2 und 5 Stunden, je einer 3 und 7 Stunden nach Beendigung der Versuchsmahlzeit, bestehend aus 600 g Reis, die in 1800 g Wasser gekocht wurden, getötet wurden. Die verabreichte Nahrungsmenge entsprach also ungefähr dem normalen Nahrungsbedürfnisse der verwendeten Tiere. Da die Versuchsmahlzeit und dementsprechend auch die Magen- und Dünndarminhalte dünnbreiige Massen vorstellten, so war ein glattes Filtrieren der letzteren nicht ohne weiteres möglich, die Inhalte mußten vielmehr mit Wasser verdünnt und die Filterrückstände mehrfach mit Wasser nachgewaschen werden. Die Untersuchung der Filtrate erfolgte in genau derselben Weise wie beim Pferde. Aus den Dünndarminhalten wurden außerdem nach Siegfried[2]) durch Aussalzen mit Eisenammoniakalaun

[1]) Ellenberger und Hofmeister, Über die Verdauung der Stärke bei Hunden. Archiv f. (Anatomie und) Physiologie **1891**, 212.

[2]) Siegfried, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **33**, 2852. Ztschr. f. physiol. Chem. **35**, 167.

die Peptone isoliert und deren Stickstoffgehalt bestimmt. Trotzdem alle Hunde einige Tage vor dem Versuche zur Abtreibung von Eingeweidewürmern mit Santonin behandelt wurden, fanden sich bei einem Tiere (Hund 6, getötet 5 Stunden post pab.) große Mengen dieser Schmarotzer vor, so daß auf eine Untersuchung des Dünndarminhaltes verzichtet werden mußte. Der gleiche Hund erbrach außerdem, nachdem er erschossen war, geringe Mengen seines Mageninhaltes, so daß die Resultate, die ich für seine Magenverdauung, natürlich unter Berücksichtigung der erbrochenen Menge, gewonnen habe, kein ganz genaues Bild der tatsächlichen Verhältnisse geben dürften. Immerhin habe ich sie mit aufgenommen, da wegen der nur geringen Mengen des Erbrochenen die tatsächlichen Werte von den gefundenen wohl nur um ein geringes abweichen dürften, wenn auch nicht zu verkennen ist, daß in der ösophagusseitigen Hälfte des Hundemagens die Verhältnisse der Abbauprodukte des Eiweißes, wie auch der übrigen Nährstoffe ganz andere sind als in der pylorusseitigen.

Versuchsergebnisse.

Nach London und Polowzowa (a. a. O.) findet bei Weißbrotfütterung die Entleerung des Magens in ungefähr der Weise statt, daß nach 1 Stunde ca. 32,6 %, nach 6 Stunden 50,5 %, nach 3 Stunden 80 % und nach 6 Stunden nahezu 94 % der verfütterten Trockensubstanz in den Darm übergetreten sind, daß also die Hälfte der verfütterten Trockensubstanz in den ersten 2 Stunden den Magen verläßt und nach 6 Stunden dieser fast vollständig leer ist. Ich habe diese Beobachtung nicht bestätigen können, wie folgende Zahlen zeigen:

	Trockensubstanz des Mageninhaltes	Trockensubstanz des Darminhaltes
Hund 1 (1 Std.)	443,3 g	49,8 g
„ 2 (1 „)	517,4 „	13,2 „
„ 3 (2 „)	417,8 „	38,2 „
„ 4 (2 „)	484,6 „	37,7 „
„ 5 (3 „)	279,2 „	158,1 „
„ 6 (5 „)	317,0 „	— „
„ 7 (5 „)	349,1 „	66,9 „
„ 8 (7 „)	358,6 „	69,2 „

Da die Trockensubstanz des verfütterten Reises **522,3** g betrug, so ergeben sich, vorausgesetzt, daß man, wie London und Polowzowa, keine Resorptionstätigkeit des Magens annimmt, und wenn man den Trockensubstanzgehalt der Verdauungssäfte unberücksichtigt läßt, für die Entleerung der im Magen enthaltenen Trockensubstanz nach dem Darme folgende Werte in Prozenten:

Hund 1 (1 Std.)	15,13%
„ 2 (1 „)	0,94%
„ 3 (2 „)	20,00%
„ 4 (2 „)	7,80%
„ 5 (3 „)	46,55%
„ 6 (5 „)	39,31%
„ 7 (5 „)	33,16%
„ 8 (7 „)	31,35%

Zieht man von der im Magen vorhandenen Trockensubstanz diejenige der Verdauungssäfte (Speichel und Magensaft) ab, so erhöhen sich diese Werte noch um ein geringes, erreichen aber bei weitem nicht diejenigen der genannten Autoren, selbst Hund 5 (getötet 3 Stunden post pab.), der die weitaus größte Menge des Mageninhaltes nach dem Darm entleert hatte, enthält noch mehr als die Hälfte des verabreichten Futters imMagen. Ob diese Verschiedenheit der Tatsachen in der verschiedenen Art und Menge des angewandten Futters oder in dem immerhin vorhandenen mehr oder weniger pathologischen Zustande der Fistelhunde ihren Grund hat, wage ich nicht zu entscheiden. Ich möchte hier nur bemerken, daß in unserem Institute gelegentlich anderer Untersuchungen bei Pferden und Schweinen selbst nach 12stündiger Verdauung nicht unbeträchtliche Mengen des Futters noch im Magen vorhanden waren. Nach Ellenberger und Hofmeister[1]) erfolgte die Entleerung der in dem Reis enthaltenen Stärke in den Dünndarm bez. das Verschwinden derselben aus dem Magen des Hundes in folgender Weise:

1 Std.	8,4%
2 „	25%
3 „	50%

[1]) Ellenberger und Hofmeister, Archiv f. (Anatomie u.) Physiol. **1891**, 216.

4 Std.	82 %
6 „	91 %
8 „	99 %
10 „	fast 100 %

also auch viel langsamer als bei London und Polowzowa für die Trockensubstanz angegeben ist. Da bei Reis die Kohlehydrate 80 und mehr % Trockensubstanz ausmachen, so kann man Trockensubstanz und Stärke fast als identisch annehmen.

Für das Verschwinden des verfütterten Eiweißes bezw. der entsprechenden Stickstoffmenge ohne Berücksichtigung des Eiweißgehaltes der Verdauungssäfte aus dem Magen ergaben sich folgende Werte:

Verfütterter Stickstoff: 6,70

		Im Magen vorhandener N	Aus dem Magen verschwundener N	
		g	g	%
Hund 1	(1 Std.)	7,46	—	—
„ 2	(1 „)	8,84	—	—
„ 3	(2 „)	5,73	0,97	14,48
„ 4	(2 „)	6,32	0,38	5,67
„ 5	(3 „)	3,93	2,77	41,36
„ 6	(5 „)	4,47	2,23	33,30
„ 7	(5 „)	4,76	1,94	28,97
„ 8	(7 „)	5,06	1,64	24,49

Da auf Grund von Untersuchungen, die in unserem Institute ausgeführt wurden, aber noch nicht zur Veröffentlichung gelangten, der Stickstoffgehalt des Mageninhaltes des Hundes bei eiweißfreier Nahrung (Sago) durchschnittlich ca. 0,024 % beträgt[1]), und die Menge dieses Stickstoffs somit lediglich den im Magen vorhandenen Verdauungssäften entstammt, so würden sich, unter der Voraussetzung, daß bei Reisfütterung dieser Stickstoffgehalt sich nicht oder nur unwesentlich änderte, für das Verschwinden des Nahrungsstickstoffs aus dem Magen folgende Zahlen ergeben:

---

[1]) Lötsch, Über den Stickstoffgehalt des Magen-Darminhaltes des Hundes bei amylaceenreicher N-freier Nahrung. Nach Angaben des Herrn Dr. Scheunert.

	Im Magen vorhandener Nahrungsstickstoff	Verschwundener Stickstoff	
	g	g	%
Hund 1	7,00	—	—
„ 2	8,35	—	—
„ 3	5,29	1,41	21,04
„ 4	5,85	0,85	12,69
„ 5	3,67	3,03	45,22
„ 6	4,12	2,58	38,51
„ 7	4,44	2,26	33,73
„ 8	4,66	2,04	30,45

Die nahezu vollständige Übereinstimmung der hier gefundenen Prozentzahlen mit denen, die für das Verschwinden der Trockensubstanz aus dem Magen angegeben sind, lassen sehr wohl den Schluß berechtigt erscheinen, daß ein gleichmäßiges Fortrücken des Mageninhaltes in den Dünndarm stattfindet, daß also für die vorliegende Untersuchung die Sortierungsfähigkeit des Hundemagens kaum existieren dürfte, wie sie von London und Polowzowa angenommen wird. Es scheinen danach beim Hunde ganz ähnliche Verhältnisse vorzuherrschen, wie sie Scheunert[1]) für das Pferd fand. Man wird aber auch zu dem weiteren Schlusse berechtigt sein, daß im Hundemagen eine wesentliche Resorptionstätigkeit nicht stattfindet, da kaum anzunehmen ist, daß die Abbauprodukte der einzelnen Nährstoffe in demselben Verhältnisse zur Resorption gelangen, in welchem sie in dem verabreichten Futter enthalten sind. Für den Fall, daß eine Resorption von Nahrungsstoffen im Hundemagen stattfände, müßte sie in diesem Verhältnisse ablaufen, da ja, wie oben gezeigt wurde, die Prozentmengen der verschwundenen Trockensubstanz und des verschwundenen Stickstoffs nahezu übereinstimmen. Die Befunde von Tobler[2]) und Lang[3]), nach denen eine beträchtliche Resorption im Hundemagen stattfindet, erhalten demnach durch meine Resultate keine Bestätigung.

Daß bei Hund 1 und 2 mit dem zugrunde gelegten Durchschnittswerte des Körperstickstoffs keine befriedigenden Resul-

[1]) Scheunert, Über den Einfluß der Körperbewegung auf die Verdauung und Nährstoffabsorption des Pferdes. Pflügers Archiv **109**, 145.
[2]) Tobler, Ztschr. f. physiol. Chem. **45**, 185.
[3]) Lang, diese Zeitschrift **2**, 225.

tate erhalten wurden, liegt in der Individualität der betr. Tiere begründet, die vielleicht mehr oder einen an Stickstoff reicheren Magensaft absonderten, als die übrigen, sodaß das bedeutende Plus an Stickstoff im Mageninhalte dieser Tiere leicht erklärlich ist.

In einem gewissen Zusammenhange mit dem Füllungsgrade des Magens steht die Menge des gelösten Eiweißes. Je mehr zu einer bestimmten Zeit der Magen entleert wurde, um so größer ist auch die Menge des gelösten Eiweißes. So beträgt z. B. bei Hund 1, der nach 1 Stunde getötet wurde, die Menge des gelösten Stickstoffes 12,12 % des im Magen überhaupt vorhandenen Stickstoffs, bei Hund 2, der ebenfalls nach 1 Stunde getötet wurde, und bei dem eine viel geringere Menge des Mageninhaltes nach dem Darm übergetreten ist, nur 6,27 %. Ganz ähnliche Verhältnisse kehren auch bei den Hunden 3 und 4 (2 Stunden) und 6 und 7 (5 Stunden) wieder (vergl. Tab. I). Bei den nach 2 Stunden getöteten Tieren betragen die entsprechenden Mengen gelösten Stickstoffs 13,07 % und 9,21 %, bei den nach 5 Stunden getöteten 17,86 % und 9,75 %. Auf Grund dieses Befundes kann man vielleicht auch hier, wie dies Goldschmidt[1]) für Pferde tat, von Tieren mit stärkerer und schwächerer Verdauung sprechen. Es ist hierbei bemerkenswert, daß, wie ich auch schon früher zu beobachten mehrfach Gelegenheit hatte, die Verdauungsintensität parallel verläuft mit der Motilität des Magens, d. h. daß mit Abnahme der Motilität auch die Menge der Verdauungsprodukte sinkt. Diese Tatsache darf man jedoch nicht den Befunden Scheunerts[2]) gegenüberstellen, der konstatierte, daß bei bewegten Tieren die Motilität des Magens sinkt gegenüber der ruhender Tiere, da gerade hier infolge reichlicherer Wasser- bezw. Saftsekretion besonders in den späteren Stunden auch die Menge der Verdauungsprodukte ansteigt. Es handelt sich bei mir lediglich um Tiere, die in der Zeit, die zwischen Fütterung und Tötung lag, geruht hatten.

Daß im Mageninhalte des Pferdes besonders in den ersten Verdauungsstunden sich viel Syntonin vorfindet, was beim Hunde nicht der Fall ist, dürfte sich durch folgende Tatsachen erklären

---

[1]) Goldschmidt, Ztschr. f. physiol. Chem. **11**, 425.

[2]) Scheunert a. a. O.

Tabelle I. Verteilung des gelösten Stickstoffs

Nr. des Hundes	Getötet Stunden post. pab.	Im Magen überhaupt vorhandener Stickstoff	Im Magen vorhandener gelöster Stickstoff	Entsprechend % des Gesamtstickstoffs	Die Menge			
					Syntonin		Protalbumose	
		g	g	%	g	%	g	%
1	1	7,46	0,824	12,12	Spuren		Spuren	
2	1	8,84	0,554	6,27	„		0,056	10,04
3	2	5,73	0,749	13,07	„		0,010	1,34
4	2	6,32	0,582	9,21	0	0	Spuren	
5	3	3,93	0,659	16,77	0,047	7,10	0,053	8,09
6	5	4,47	0,799	17,86	Spuren		0,030	3,79
7	5	4,76	0,464	9,75	„		Spuren	
8	7	5,06	1,507	29,78	„		0,106	7,02

lassen. Beim Magen des Pferdes befindet sich linksseitig, gewissermaßen als Fortsetzung des Ösophagus, eine drüsenfreie, nicht sezernierende, mit einem vielschichtigen, in den oberen Schichten verhornten Epithel bedeckte Zone, die einen sehr großen Raum — ca. $^1/_3$ — des Magens einnimmt, sodaß für den eigentlichen Drüsenmagen, die Fundusdrüsen- und Pylorusdrüsenregion, nur noch ein relativ geringer Raum bleibt. Die Pylorusdrüsenregion ist außerdem sehr arm an Pepsin, d. h. sie produziert, wie die Ergebnisse der in unserem Institute angestellten Versuche zeigen, nur wenig Pepsin, sodaß fast nur der Fundusdrüsenregion die Absonderung proteolytisch wirksamen Saftes zukommt. Beim Hunde hingegen fällt die regio oesophagea weg, nahezu der ganze Magen ist danach fähig, proteolytische Säfte abzusondern. Und nicht nur die pepsinhaltige Schleimhautfläche, sondern auch die Salzsäure bildende Fläche ist im Hundemagen viel größer als im Pferdemagen. Infolgedessen kann eine Milchsäuregärung und damit eine Bildung von Syntonin aus dem verfütterten Eiweiß nur in sehr beschränktem Maße auftreten, da ja durch die reichlich sezernierte HCl die Milchsäuregärung sehr bald sistiert und entstandenes Syntonin außerordentlich rasch zu Albumosen und Pepton abgebaut wird, während beim Pferde erst sehr spät genügend Salzsäure gebildet ist, um eine Sistierung der Milchsäuregärung zu ermöglichen; da auch die Bildung von Pepsin in viel geringerem Maße statt hat als beim Hunde, kann das infolge der

auf die einzelnen Abbauprodukte im Magen.

des gelösten Stickstoffes verteilt sich auf

Deuteroalbumose						Peptone	
A		B		C			
g	%	g	%	g	%	g	%
0,054	6,59	0,153	18,69	0,130	15,75	0,485	58,97
0,040	7,17	0,289	52,16	0	0	0,169	30,50
0,103	13,74	0,316	42,21	0	0	0,318	42,38
0,180	31,01	0,064	11,00	Spuren		0,330	56,73
0,082	12,50	0,119	18,18	"		0,348	52,90
0,159	19,90	0,368	46,08	"		0,230	28,80
0,044	9,43	0,189	40,76	"		0,219	47,18
0,048	3,27	0,625	41,50	0,082	5,43	0,640	42,46

Milchsäuregärung gebildete Syntonin erst viel später und langsamer abgebaut werden, als dies beim Hunde der Fall ist. In der Tat treten beim Hunde immer nur Spuren oder sehr geringe Mengen (Hund 5, 3 Stunden) von Syntonin auf, wie dies auch schon Zunz[1]) bei Fleischfütterung fand.

Wie dieser bei den Mengenverhältnissen der Albumosen und Peptone keinerlei Regelmäßigkeiten feststellen konnte, so ist dies auch bei meinen Versuchen der Fall, wie ein Blick auf die Tab. I lehrt. Einen Unterschied von den Zunzschen Resultaten gibt es aber doch, während Zunz nämlich Peptone nur in geringem Maße im Mageninhalte seiner Hunde vorfand, ist bei meinen Hunden immer sehr viel, bis nahezu $^3/_5$ des überhaupt gelösten Stickstoffs bei einzelnen Hunden hiervon im Magen enthalten. Aus diesem Umstande ergibt sich eine Bestätigung und Erweiterung des Befundes von London und Polowzowa, daß pflanzliches Eiweiß leichter und schneller im Hundemagen eine Spaltung erleidet als tierisches. Merkwürdig ist das Vorhandensein immer nur sehr geringer Mengen bezw. das Fehlen der der Deuteroalbumose C entsprechenden Fraktion, die nur bei einem Hunde (1) 15,75% des gelösten Stickstoffs enthält, bei anderen Hunden aber nur in so geringen Mengen auftritt, daß es unmöglich war, den N-Gehalt zu bestimmen. Dieser Befund ähnelt ganz dem von mir beim Pferde

[1]) Zunz, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 342.

Tabelle II. Die Verteilung des gelösten Stick-

Nr. des Hundes	Getötet Stunden post. pab.	Im Dünndarme überhaupt vorhandener Stickstoff	Im Dünndarme vorhandener gelöster Stickstoff	Entsprechend % des Gesamtstickstoffs	Die Menge			
					Protalbumose		Deuteroalbumose A	
		g	g	%	g	%	g	%
1	1	1,866	1,187	63,62	0,101	8,52	0,256	21,60
2	1	0,615	0,492	80,07	0,048	9,79	Spuren	
3	2	1,906	1,414	74,17	0,070	4,92	„	
4	2	1,108	0,790	71,12	Spuren		0,014	1,79
5	3	2,386	0,460	19,28	„		0,038	8,35
7	5	1,102	0,415	37,68	0,035	8,33	Spuren	
8	7	2,212	1,075	48,62	0,164	15,28	0,045	4,22

erhaltenen Resultate[1]), wo diese Fraktion auch nur wenig hervortritt, und sehr bald verschwindet. Auch bei Zunz entfällt im allgemeinen auf diese Fraktion nicht sehr viel Stickstoff. Anders verhält es sich mit der Protalbumose. Auch die auf diese zu beziehende Stickstoffmenge tritt bei meinen Hunden nicht sehr hervor, während bei Zunz gerade auf diese Fraktion die Hauptmenge des N entfällt und bei meinen Versuchen an Pferden wenigstens in den ersten fünf Stunden der Stickstoffgehalt der übrigen Albumosen gegen den der Protalbumose wesentlich zurücktritt. Die größte Stickstoffmenge entfällt bei meinen Versuchen auf die Deuteroalbumose B, die in der Mehrzahl der von mir untersuchten Fälle 40 bis 50% des gelösten Stickstoffes enthält, wenn auch bei zwei Tieren diese Menge weit unterhalb dieser Grenze liegt, und zwar, wie es scheint, zugunsten der Peptone, deren Menge gerade bei diesen Tieren besonders hoch ist. Die Deuteroalbumose A endlich, der die nächstgrößte Menge des gelösten Stickstoffs zukommt, zeigt auch keinerlei Regelmäßigkeiten in bezug auf ihre Menge, sie schwankt ebenfalls innerhalb großer Grenzen. Die Menge der Albumosen überhaupt und die der Peptone sind einander annähernd gleich, — mit zwei Ausnahmen —, die Beobachtung von London und Polowzowa, daß im Magen die Albumosen wesentlich überwiegen, kann ich also nicht bestätigen.

Bezüglich der Darmverdauung möchte ich auch hier wieder darauf hinweisen, daß ein außerordentlich großer Teil des im

[1]) Grimmer, diese Zeitschrift 2, 133. 1906.

stoffs auf die Abbauprodukte im Dünndarme.

des gelösten Stickstoffes verteilt sich auf

Deuteroalbumose				Peptone		Restkörper	
B		C					
g	%	g	%	g	%	g	%
0,064	5,40	Spuren		0,119	10,04	0,639	53,83
0,140	28,45	0	0	0,022	4,41	0,286	57,31
0,085	6,01	0,535	37,82	0,044	3,11	0,674	47,66
0,188	23,81	Spuren		0,212	26,89	0,368	46,65
0,105	22,87	0,058	12,70	0,058	12,64	0,187	40,61
0,160	38,53	0	0	0,053	12,76	0,165	39,03
0,325	30,24	Spuren		0,128	11,89	0,408	37,98

Dünndarme vorhandenen Eiweißes den Verdauungssäften entstammt. Wie von anderer Seite in unserem Institute in der oben erwähnten noch zu veröffentlichenden Arbeit gezeigt worden ist, beträgt der Stickstoffgehalt des trockenen Dünndarminhaltes bei eiweißfreier Nahrung ca. 6 bis 9,5 %. Bei den von mir untersuchten Hunden ergaben sich folgende Zahlen:

	Trockensubstanz des Dünndarminhaltes	Stickstoffgehalt	
	g	g	%
Hund 1 (1 Std.)	49,8	1,866	3,75
„ 2 (1 „)	13,2	0,615	4,66
„ 3 (2 „)	38,2	1,906	4,99
„ 4 (2 „)	37,7	1,108	2,94
„ 5 (3 „)	158,1	2,386	1,51
„ 7 (5 „)	66,9	1,102	1,65
„ 8 (7 „)	69,2	2,212	3,19

Derartig hohe Werte wie bei N-freier Nahrung habe ich, wie ein Blick auf die obige Zusammenstellung zeigt, nicht erhalten; mit zwei Ausnahmen enthalten die Dünndarminhalte der von mir verwendeten Hunde ca. 3 bis 5 % Stickstoff. Der Stickstoffgehalt steht übrigens in sehr engen Beziehungen zum Trockensubstanzgehalte des Dünndarminhaltes derart, daß dünne, nur wenig Trockensubstanz enthaltende Inhalte viel mehr Stickstoff enthalten, als dickere mit sehr hohem Trockensubstanzgehalt, wie aus folgender Zusammenstellung deutlich ersichtlich ist:

	Trockensubstanzgehalt des Dünndarminhaltes %	Stickstoffgehalt in der Trockensubstanz %
Hund 1	28,54	3,75
„ 2	19,73	4,66
„ 3	19,41	4,99
„ 4	24,79	2,94
„ 5	29,55	1,51
„ 7	33,08	1,65
„ 8	26,41	3,19

Auf Grund dieser Tatsachen kommt man notwendigerweise zu dem Schlusse, daß die Ursache dieser Verschiedenheiten in der schwankenden Menge der vorhandenen Verdauungssäfte, die sich in den Dünndarm ergießen, zu suchen ist. Der außerordentlich niedrige Stickstoffgehalt des Dünndarminhaltes bei Hund 5 und 7, der denjenigen des Reises (1,12 %) nur um ein geringes übersteigt, läßt demnach darauf schließen, daß hier nur sehr geringe Mengen von Verdauungssäften sich in den Dünndarm ergossen haben, besonders auch, da auf die gelösten Anteile des Stickstoffs nur 19,28 bezw. 37,68 % entfallen (vergl. Tab. II), während bei den anderen Hunden meist 60 bis 80 % gelöst sind. Andererseits ersieht man aus der obigen Zusammenstellung zur Evidenz, in wie großem Maße gerade im Dünndarm das Körpereiweiß gegenüber dem Nahrungseiweiß prävalieren kann, das letztere bildet in der Mehrzahl der Fälle höchstens $^1/_3$ bis $^1/_4$ des im Dünndarm überhaupt vorhandenen Eiweißes, und dieses Verhältnis verschiebt sich sicher noch viel mehr zugunsten des Körpereiweißes bei den gelösten Anteilen. Nach den beim Pferde gemachten Erfahrungen läßt sich die Größe des verdauten Eiweißes infolgedessen auch nur unsicher, des resorbierten Eiweißes überhaupt nicht berechnen, selbst unter der bei meinen Versuchen zu machenden Annahme, daß ein gleichmäßiges Fortrücken des Mageninhaltes in dem Dünndarm stattfindet.

In bezug auf die Menge der einzelnen Abbauprodukte des Eiweißes herrscht auch im Dünndarm keinerlei Regelmäßigkeit, sie sind hier ganz im Gegenteile zu den Befunden beim Pferde recht bedeutenden Schwankungen unterworfen. Dies läßt sich zum großen Teile dadurch erklären, daß der Trockensubstanzgehalt der Dünndarminhalte der Hunde im Vergleich zu denen der Pferde

außerordentlich groß ist und in sehr großen Grenzen schwankt. Während er beim Pferde ca. 3,5 bis 4 % betrug, schwankt er beim Hunde zwischen 19 % und 33 %. Beim Pferde überwiegt also die Menge und wohl auch der Wassergehalt der Verdauungssäfte im Dünndarm ganz außerordentlich, ihre Einwirkung auf gelöstes und ungelöstes Eiweiß muß also auch eine intensivere sein. Die Hauptmenge des gelösten Stickstoffs entfällt beim Hunde in allen Fällen auf die als Restkörper bezeichneten, nicht mehr aussalzbaren Produkte (Polypeptide und Aminosäuren). Die Summe dieser und der Peptone schwankt innerhalb geringer Grenzen, nämlich zwischen ca. 50 und 60 %, gleichgültig zu welcher Verdauungsstunde das betreffende Tier getötet wurde. Es ist auffallend, daß ein Fortschreiten der Verdauung sich nicht in dem Sinne geltend macht, daß, wie ich es früher beim Pferde und Zunz bei Hunden mit Fleischfütterung gefunden haben, die absolute und relative Menge der Endprodukte der Dünndarmverdauung anwächst. Auch bei London und Polowzowa kann man beim Duodenumfistelhund und Jejunumfistelhund mit zunehmender Verdauungszeit eine Abnahme der Albumosen und Zunahme der Peptone + Restkörper unschwer erkennen (vergl. Tab. C I und D I der zitierten Arbeit). Betreffs der Albumosenfraktionen ist nur zu bemerken, daß im vorliegenden Falle ebenso wie bei der Magenverdauung die Deuteroalbumose B die Hauptrolle spielt. Ihr folgt die Fraktion der Protalbumose, während die übrigen Fraktionen nur selten eine größere Menge Stickstoff enthalten.

Zusammenfassung.

Die von mir angestellten Untersuchungen, die einen Beitrag zur Lösung der Frage der Eiweißverdauung des Hundes bei pflanzlicher Nahrung bilden sollen, haben die vorliegenden Resultate ergeben, die sich in Kürze folgendermaßen zusammenfassen lassen:

1. Der Magen des Hundes besitzt nach den vorliegenden Versuchen keine Sortierungsfähigkeit, d. h. er ist nicht befähigt, aus einem Gemische verschiedener Nahrungsstoffe einzelne derselben, z. B. Kohlehydrate, schneller in den Dünndarm zu befördern als andere, z. B. Eiweiß. Der Mageninhalt rückt im Gegenteile gleichmäßig nach dem Dünndarm vor. Nach frühestens 3 Stunden sind ca. 50 % aus dem Magen verschwunden, wenn dieser normal

gefüllt wird, eine schnellere Entleerung findet nur bei ungenügender Futtermenge oder unter pathologischen Verhältnissen statt.

2. Dem Magen des Hundes kann eine Resorptionsfähigkeit von Verdauungsprodukten nur in sehr geringem Maße zugesprochen werden.

3. Die Menge des im Magen vorhandenen gelösten Eiweißes ist bis zu einem gewissen Grade abhängig von dem Füllungszustande des Magens. Je gefüllter er ist, um so geringere Mengen Eiweiß befinden sich — absolut wie relativ — in Lösung. Auf die relative Menge der Peptone scheint der Füllungszustand des Magens keinen Einfluß zu haben.

4. In bezug auf die Menge der einzelnen Abbauprodukte des Eiweißes im Magen des Hundes herrschen im Gegensatze zu meinen Befunden beim Pferde keinerlei Regelmäßigkeiten. Syntonin findet sich zu allen Verdauungsstunden nur in sehr geringen Mengen, die Menge der Peptone ist bereits in der ersten Verdauungsstunde relativ und absolut sehr groß. Ein Anwachsen der Peptone mit zunehmender Verdauungszeit in relativer Menge konnte nicht festgestellt werden.

5. Der Trockensubstanzgehalt des Dünndarminhaltes ist außerordentlich großen Schwanken unterworfen, er schwankt zwischen 19 und 33 % und ist abhängig von der Menge der in den Dünndarm ergossenen Verdauungssäfte. Von diesen ist auch der relative und absolute Gehalt des Dünndarminhaltes an Stickstoff abhängig.

6. In bezug auf die Menge der Abbauprodukte des Eiweißes herrscht auch im Dünndarm keine Regelmäßigkeit. Die Summe der Peptone und der nicht mehr aussalzbaren Restkörper schwankt in der Mehrzahl der Fälle nur zwischen 50 und 60 %.

Die „Katalase“ der Frauenmilch.

Von

Dr. R. v. d. Velden,

Assistenzarzt an der Klinik.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Marburg.
Professor Dr. Brauer.)

(Eingegangen am 17. Januar 1907.)

Die Milch ist in den letzten Jahren in ganz hervorragendem Maße teils aus praktischen, teils aus biologischen Interessen in den verschiedensten Richtungen studiert worden. Die Sammelreferate von Raudnitz legen davon ein beredtes Zeugnis ab. Namentlich schien die Milch für das Studium der Fermente ein geeignetes Ausgangsmaterial zu sein. Im Verlaufe von Untersuchungen über Oxydationsfermente, speziell der Katalase und der Peroxydase bei Warmblütern, wurden auch die Oxydationsfermente der Milch, und zwar speziell die „Katalase“ der Frauenmilch in den Rahmen meiner Untersuchungen hineingezogen. Die Resultate, die sich hierbei ergaben, seien im folgenden kurz wiedergegeben. Sie haben wohl weniger praktisches wie biologisches Interesse. Die Untersuchungen sind zum Teil in Heidelberg im pharmakologischen Institut, zum Teil in der Marburger medizinischen Klinik ausgeführt worden.

Die Bestimmung der Katalase erfolgte mit dem von einem Schüler Bredigs, Walton[1]), konstruierten Schüttelapparat. In einem Wasserbade von konstanter Temperatur (37 ° C.) befindet sich der Schüttelkolben verbunden durch ein Kapillar-Glasrohr mit einer Glasbürette, die in einen auf gleicher Temperatur (15 ° C.)

---

[1]) Diss. Heidelberg 05.

gehaltenen Kühler eingefügt ist. Durch eine kleine Wasserturbine wird der Kolben geschüttelt, in dem sich mittels eines Seitenansatzes der einfache Mechanismus des Meyerschen Fallröhrchens eingefügt findet. Es wurden verwandt 5 oder 10 ccm Frauenmilch und hinzugefügt wurde 0,5—1,0 30%iges reines unzersetztes Wasserstoffsuperoxyd (Merks Perhydrol). Geschüttelt wurde 10 Minuten. Die Hauptentwickelung des Sauerstoffes, die in den ersten 6—7 Minuten erfolgt, wurde von Minute zu Minute durch Ablesen von der Glasbürette genau verfolgt. Der Endwert ist die Zahl, die sich in dem folgenden Protokoll immer verzeichnet findet. Die Schüttelgeschwindigkeit, d. h. die Zahl der Umdrehungen der Turbine war stets die gleiche. Bei vorsichtigem und genauem Arbeiten gibt der Apparat, von dessen Dichtigkeit man sich natürlich fortlaufend überzeugen muß, stets konstante Werte. Im übrigen wurde genau nach den Vorschriften der Bredigschen Schule gearbeitet. Alle Bestimmungen wurden doppelt ausgeführt.

Die zu den Untersuchungen benötigte Milch wurde mittels Milchpumpe der Mutterbrust entnommen und zwar teils von Wöchnerinnen aus der Heidelberger Frauenklinik, teils von den Ammen unseres Säuglingheims, oder von schon länger stillenden Frauen der Klinik. Die Entnahme erfolgte in sterilen Gefäßen mit steriler Pumpe nach vorsichtiger mechanischer wie Alkohol- resp. Borsäure-Desinfektion der Brustwarze. Weiteres findet sich darüber im Verlaufe der Arbeit. Die so gewonnene Milch wurde sofort oder spätestens nach 1—2 Stunden untersucht.

Untersuchungen über die Katalase resp. die H_2O_2 zersetzenden fermentativen Eigenschaften der Frauenmilch liegen bereits vor[1]). Sie betonen im allgemeinen neben anderem den Unterschied zwischen dem Vorhandensein der Katalase bei der Frau oder dem Fehlen oder nur geringen Gehalte an Katalase bei der Kuh. Das Ziel folgender Untersuchungen war es, im Verlaufe längerer über Tage und Wochen sich erstreckender Beobachtungen sich ein Urteil zu bilden über die Schwankungen der Katalase, über ihre Beeinflussung von seiten des Organismus, ferner sollte beobachtet werden, ob und welche Beziehungen zur Ernährung resp. zum

[1]) S. Raudnitz, Ergeb. d. Phys. **2**, 1, 274 und die jährlichen Sammelreferate in der Monatsschrift für Kinderheilkunde.

Gedeihen des Kindes dabei bestehen. In letzter Zeit ist ja öfters darauf hingewiesen worden, daß die verschiedensten Fermente, die man in den diversen Milcharten gefunden hat, und die namentlich zwischen Kuh- und Frauenmilch Differenzen zeigen, mit einen Grund darstellen für die verschiedene Bekömmlichkeit der einzelnen Milcharten, Ansichten, die nicht unwidersproehen geblieben sind.

Vergleicht man nun zuerst die absoluten Werte der sog. „Katalase", wie ich sie mit der obigen Methode gewonnen habe, und zwar die absoluten Werte zwischen den einzelnen Frauen, so findet man beim Vergleiche von Frauen, denen zu gleicher Zeit und unter gleichen äußeren Bedingungen die Milch entnommen wurde und die in derselben Laktationszeit stehen, keinerlei Übereinstimmung. Die Werte schwanken zwischen 40 und 5[1]). Man kann einer Milch nicht im allgemeinen ansehen, ob sie viel oder wenig Katalase in sich birgt. Die sog. dünne Milch kann bald mehr, bald weniger zeigen als die gute fette weiße Milch einer anderen Frau. Nur zur Zeit des Einschießens der Milch (das Kolostrum ist nur einigemale untersucht worden, da im allgemeinen die nötige Menge von 5 ccm nicht stets zu erhalten ist) findet sich fast stets bei allen Frauen gleichmäßig sehr starker „Katalase"-Gehalt, für den oft die vorhandene Gasbürette (50 ccm) nicht ausreichte. Sieht man von den absoluten Werten ab und vergleicht man nur die Verlaufsform der Katalasekurve, wie ich sie bei Wöchnerinnen und bei im 6. und 7. Monat stillenden Frauen, natürlich stets unter den gleichen Untersuchungsbedingungen, gewonnen habe, so findet man auch hier nur insofern eine Übereinstimmung, als in den ersten 3—5 Tagen bei den Wöchnerinnen ein Absinken von hohen Katalasewerten zu einem tieferliegenden Niveau stattfindet. Dieses Niveau wird aber so und so oft wieder unterbrochen durch bald erhöhte, bald erniedrigte Werte. Namentlich findet sich bei den in späterer Laktationszeit befindlichen Frauen selten eine gleichmäßig verlaufende Kurve, die Tag für Tag auch nur annähernd gleiche Werte gäbe. Geht man nun zur Analyse der Katalasewerte bei den einzelnen Personen über, so findet man das unregelmäßige Verhalten im Auftreten dieser fermentativen Eigenschaft

[1]) Die Zahlen bedeuten die in 10 Minuten entwickelten ccm Sauerstoff aus 5 ccm Milch und 0,5 ccm H_2O_2 (30 %) bei 37° C. geschüttelt.

nicht nur in Tagesschwankungen, sondern auch in Stundenschwankungen, und diese Schwankungen finden sich weiter im Verlaufe einer Stillzeit, d. h. die Anfangsmilch hat ganz andere Werte, wie die während des Säugens oder nach dem Stillen entnommene Milch. Letztere Angaben finden unten nähere Beachtung. Daß Differenzen bestehen zwischen rechter und linker Brust, wird nach dem Vorhergesagten und nach dem, was wir über die Milchsekretion und die verschiedene Drüsenarbeit der beiden Brüste wissen, ja weiter nicht wundernehmen und ist ja auch schon von anderer Seite hervorgehoben worden.

Das Obengesagte mögen einige kurze Auszüge aus den Untersuchungsreihen illustrieren.

1. P. (Wöchnerin).			2. Oe. (Wöchnerin).			3. K. (Amme).	
1. XII. 05.	III.	32,0	28. XI. 05.	III.	42,2	11. IV. 06.	10,0
2. XII. 05.	IV.	36,0	29. XI. 05.	IV.	21,1	12. IV. 06.	5,6
3. XII. 05.	V.	13,0	30. XI. 05.	V.	9,8	13. IV. 05.	50,7
4. XII. 05.	VI.	1,0	1. XII. 05.	VI.	11,5	**4. B. (Amme).**	
5. XII. 05.	VII.	1,2	2. XII. 05.	VII.	19,3	13. V. 06.	18,2
6. XII. 05.	VIII.	3,8	3. XII. 05.	VIII.	19,8	14. V. 06.	21,4
7. XII. 05.	IX.	1,7				15. V. 06.	16,4

5. Fr. (still. Frau).

r. Brust		l. Brust
25. I. 06.	3,8	1,1
26. I. 06.	2,7	2,7
27. I. 06.	5,3	1,8

	6. M. (still. Frau).	7. B. (Amme).	8. Ma. (still. Frau).
Vor dem Stillen	2,3	13,8	3,0
Nach " "	8,4	20,2	6,7

9. Ku. (Wöchnerin).			10. Eberw. (Wöchnerin).			11. D. (Amme).		
23. I. 06.	V.	2,7	23. I. 06.	V.	13,2	3. I. 06.	11 a. m.	11,1
24. I. 06.	VI.	3,0	24. I. 06.	VI.	5,1	4. I. 06.	11 a. m.	11,5
25. I. 06.	VII.	5,1	25. I. 06.	VII.	3,4	4. I. 06.	3 p. m.	8,4
26. I. 06.	VIII.	3,3	27. I. 06.	IX.	19,0	4. I. 06.	7 p. m.	13,2
27. I. 06.	IX.	4,8	28. I. 06.	X.	15,8	**12. S. (Wöchnerin).**		
28. I. 06.	X.	3,8	29. I. 06.	XI.	11,0	5. II. 06.	3 p. m.	14,3
29. I. 06.	XI.	7,3	30. I. 06.	XII.	20,8	6. II. 06.	3 p. m.	20,1
30. I. 06.	XII.	4,6				6. II. 06.	7 p. m.	12,7

Um dies bizarre und irreguläre Verhalten zu erklären, wurden folgende Kontrolluntersuchungen vorgenommen.

Von verschiedenster Seite, zuletzt wohl von Seligmann[1]) ist darauf hingewiesen worden, daß die Fermentreaktion der Milch in einem sehr engen Kausalnexus zum Bakteriengehalte der Milch stände, daß also die verschiedensten Fermente nicht „originärer" sondern bakterieller Natur seien. Es wurde daher in einer großen Reihe von Versuchen die zur Katalase-Bestimmung entnommene Milch zugleich in bakterieller Hinsicht untersucht, d. h. es wurden 0,1 und 0,2 ccm der Milch zum Teil mit Gelatine, zum Teil mit Agar in der bekannten Weise gemischt, zu Platten ausgegossen. Diese Untersuchungen ergaben das überraschende Resultat, daß es selbst bei der in diesem Falle nur irgendmöglichen Anti- und Asepsis niemals möglich war, sterile Frauenmich zu gewinnen, selbst nach gründlichster mechanischer Reinigung, nach Entfernung der ersten Milch, ja selbst nach Abpumpen von 30 bis 50 ccm aus der Brust gelang es nicht, eine ganz sterile Milch zu erhalten. Verglich man nun die Resultate der bakteriellen Untersuchung mit denen der Katalase-Bestimmung, so ergab sich, daß in einzelnen Fällen ein genau umgekehrtes Verhalten sich fand, d. h. daß die Milch, die weniger Katalase enthielt, ungeheuer viel Bakterien enthielt. Aber auch das umgekehrte Verhalten fand sich einigemale. Zum Teil war bei Untersuchungen der Gesamt-Milch zu erkennen, daß mit steigendem Bakteriengehalt ein größerer Katalasewert Hand in Hand ging. Die zahlreichen Untersuchungen haben aber für die Milch, die sofort nach der Entnahme aus der Brust untersucht wurde, nur ergeben, daß ein konstantes Parallelgehen zwischen Bakteriengehalt und Katalase nicht besteht. Ganz anders verhalten sich die Resultate, wenn man diese Milch 24 Stunden stehen läßt, dann konstatiert man mit zunehmendem Bakteriengehalt auch eine Zunahme des Katalasegehaltes, vorausgesetzt allerdings, daß die Reaktion der Milch, die ja von Einfluß ist bei der Bestimmung der „Katalase", sich nicht geändert hat. Auch hier mögen einige Protokolle das soeben Gesagte kurz illustrieren.

---

[1]) Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten **1905**, 52.

13. K. (Amme).

20. V. 06	10,2	auf Agar nur sehr wenig Kolonien nach 2 × 24 Stunden.
21. V. 06	5,0	„ „ sehr reichlich „ „ 2 × 24 „
22. V. 06	9,3	„ „ „ „ „ „ 2 × 24 „

14. M. (still. Frau).

6. XII. 1906	3,0	auf Agar zahlreiche Kolonien, erste Milch	derselben Saugzeit.
	7,4	„ „ 5 kleine „ letzte „	

15. B. (Amme).

12. IV. 1906	9,2	mittelviel Kolonien	stets aus der ersten Milch.
13. IV. 1906	18,2	zahlreiche „	
14. IV. 1906	21,4	zwei „	

16. N. (still. Frau).

8. XII. 1906 . . .	3,0	wenig Kolonien
Nach 24 Stunden .	4,3	zahlreiche Kolonien
9. XII. 1906 . . .	4,4	mittelviel Kolonien
Nach 24 Stunden .	5,6	zahlreiche Kolonien

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung des Katelasegehaltes wäre in dem Zellengehalte der Milch zu suchen und zwar schien dies um so wahrscheinlicher zu sein, als, wie ja schon oben erwähnt, das Kolostrum und die eben einschießende Milch, die ja bekanntlich sehr reich an Zellen ist, die größte katalytische Kraft auf Wasserstoffsuperoxyd entwickelte. Mittels der von Tromsdorf[1]) angegebenen Methode des Zentrifugierens in zu graduierten Spitzen ausgezogenen Röhrchen, habe ich quantitative Untersuchungen auf den Zellengehalt der Frauenmilch unternommen. Voruntersuchungen an normaler Frauenmilch ergaben entweder gar keinen oder nur einen minimalen Zellwert, der sich allerhöchstens bis 0,1 nach der Tromsdorfschen Einteilung erstreckte. Diese so gewonnenen Werte ergaben keinerlei Übereinstimmungen mit den Schwankungen des Katalasegehaltes bei den Frauen. Anders jedoch war das Resultat, wenn man starke Schwankungen, d. h. ein plötzliches Hinaufschnellen in dem Katalasegehalt der Milch fand. Dies war der Fall wenn man z. B. am Ende des Abpumpens oder nach dem Stillen etwas stark die Brustdrüse aus-

[1]) Münch. med. Wochenschr. **1906**, 541.

preßte, dies war der Fall, ferner bei der Milch abstillender Frauen, die sich ja bekanntermaßen der Kolostralmilch wieder nähert. Hierbei fanden sich Werte bei der Zellenbestimmung der Milch, die weit über das angegebene Maß hinausgingen und für 5 ccm Milch den Wert von 2,0 bis 3,0 erreichten. Die mikroskopische Untersuchung dieses Zentrifugats zeigt zahlreiche große irreguläre, zum Teil zertrümmerte Zellen. Hierfür kurz folgende Protokolle:

17. B. (Amme).				18. Ma. (Abstillend).	
13. IV. 1906	18,2	—	Zellgehalt	21,5	(abgepumpt) 1,0 Zellen.
14. IV. 1906	21,4	—		35,9	(letzte ausgepreßte Milch) = 2,5 Zellen.
15. IV. 1906	16,4	0,1			

19. F. (still. Frau).

15. VII.	13,0	— Zellen.
16. VII.	15,3	— Zellen.
16. VII.	24,2	(ausgedrückt) 2,5 Zellen.

Es findet sich also hierbei eine ganz deutliche Abhängigkeit zwischen Katalase- und Zellengehalt der Milch, doch scheint eine größere Menge von Zellen notwendig zu sein, um eine starke Beeinflussung hervorrufen zu können.

Selbst wenn aber nun nach der durch vorstehende Untersuchungen gegebenen Aufklärung die weiteren Katalasebestimmungen und Milchentnahmen unter größter Sorgfalt, mit Vermeidung der aus obigen Protokollen hervorgehenden Fehlerquellen vorgenommen wurden, so bestanden trotzdem noch Unregelmäßigkeiten in den Werten der Katalase, für die sich ein ersichtlicher Grund vorerst nicht finden ließ, ganz abgesehen davon, daß die sog. Katalase in einer großen Anzahl von Fällen weder durch Zellgehalt noch durch Bakteriengehalt irgendwie erklärt werden konnte.

Parallel laufende Fettbestimmungen der Frauenmilch sollten daher die Frage erörtern, ob zwischen Fettgehalt und Katalase sich ein Parallelismus fände. v. Liebermann[1]) hat nachgewiesen, daß beim Schwein in dem Fette des Mesenterium die stärksten Katalasemengen zu erhalten waren. Die Fettbestimmung erfolgte nach der Gerberschen Methode und wurde jeweils in 5 ccm Frauenmilch vorgenommen. Beim Vergleichen der Werte der

[1]) Pflügers Archiv **104**.

Fett- und Katalasebestimmung fand sich nun insofern eine Kongruenz, als, ebenso wie ja bekanntermaßen während des Stillens der Fettgehalt der Milch ansteigt, ein Ansteigen des Katalasegehaltes der Milch zu verzeichnen ist. Vergleicht man aber nicht die fraktioniert gewonnenen Milchmengen einer Stillzeit, sondern macht man täglich fortlaufende Untersuchungen der gesamten Milch, so ist bei gesunden stillenden Frauen bei gleichbleibendem Fettgehalte der Milch niemals eine parallele Kurve in der Katalase zu finden, auch läßt sich aus der Fettmenge kein Schluß auf die Katalasemenge ziehen.

K. (Wöchnerin).

	Kat.	Fett
23. I. 1906	5,1	6,3
24. I. 1906	3,3	6,0
25. I. 1906	4,8	6,0
26. I. 1906	3,8	2,8
27. I. 1906	7,3	6,0
28. I. 1906	4,6	6,2

E. (Wöchnerin).

	Kat.	Fett
24. I. 1906	5,1	2,0
25. I. 1906	3,4	3,4
26. I. 1906	19,0	1,7

Ma. (still. Frau).

	Kat.	Fett	
6. XII. 1906	3,0	0,3 vor	dem Stillen.
6. XII. 1906	4,4	2,0 nach	
7. XII. 1906	3,0	2,5 vor	dem Stillen.
7. XII. 1996	6,7	5,0 nach	

Zu erwähnen wäre noch, wie dies ja schon von Reiss[1]) und Faitelowitz[2]) bei der Kuhmilch nachgewiesen worden ist, daß auch bei der Frauenmilch beim Zentrifugieren die Hauptmenge der Katalase in Rahm übergeht, daß man außerdem durch Erwärmen der Milch 2 Stunden auf 65° die H_2O_2 zersetzende Fähigkeit der Milch zerstört, also das vermutliche Ferment inaktivieren kann.

Aus diesen Untersuchungen geht also hervor, daß die katalytische Eigenschaft der Frauenmilch, wie sie sich in der Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd zeigt, beeinflußt werden kann durch den Bakteriengehalt und durch den Zellengehalt der Milch, daß aber diese beiden Momente nicht ausreichen, um dadurch allein diese Fermenteigenschaft der Milch zu erklären.

[1]) Ztschr. f. klin. Med. **56**, 1—2.

[2]) Diss. Heidelberg **1904**.

Wenn auch noch eine nähere Untersuchung der Beziehungen des Katalasegehaltes der Milch zu ihrem Salzgehalte, die Raudnitz fordert, fehlt, so darf man doch sagen, daß diese fermentative Eigenschaft in ihren Grundzügen eine originäre ist, d. h, daß es sich um ein richtiges Ferment handelt, das aus den Drüsenzellen der Brustdrüse stammt. Es ist dies ja auch weiter nicht zu verwundern, daß sich in der Milch, die eine Summe darstellt von Transsudat und, wie Raudnitz es bezeichnet, Zellenbrei, daß darin sich auch unter den anderen Zelltrümmern die Zellfermente finden, wie wir sie uns z. B. mit Hilfe der Buchnerschen Presse aus Zellkomplexen darstellen können.

Wie aus den vorstehenden Untersuchungen wohl resultiert, ist es nun leider nicht möglich, bei diesen schwankenden, von vielen äußeren Dingen abhängigen „Katalase“-Werten aus den absoluten Werten selber vorerst irgend etwas Näheres über die Tätigkeit der Brustdrüse zu schließen. Es ist ja schon versucht worden, den Katalasegehalt als Indikator dafür zu benutzen, ob eine Milch mehr einfaches Transudat oder mehr Produkt der Zellarbeit der Brustdrüse wäre. Der Vollständigkeit halber möge daher noch angeführt werden, daß die Untersuchung des Katalasegehaltes bei Anwendung von Laktagogis, wie z. B. des Laktagol, in einem Falle eine starke Steigerung des Katalasegehaltes der Milch ergab, in anderen Fällen diese jedoch ganz vermissen ließ, wo auch sonst nicht die geringste Beeinflussung der Milchsekretion weder an dem Kinde, noch an der Mutter zu erkennen war. Den Befund der starken Katalaseverminderung bei schnell vorübergehendem Fieber im Puerperium möchte ich vorerst nicht anders als eine einfache Tatsache verwenden.

Schließlich möge noch kurz Erwähnung finden, was in den einleitenden Worten über den Einfluß des Fermentgehaltes der Milch auf das Gedeihen des Säuglings gesagt wurde. Das Material, das mir zur Verfügung steht, reicht wohl noch nicht hin, um ein endgültiges Urteil darüber abzugeben, reicht namentlich nicht hin, um irgendwie in der Frage der Rohmilchernährung, soweit man damit eine Fermenternährung treiben will, Stellung zu nehmen; aber auffallend ist es immerhin, daß es für das Gedeihen der Brustkinder absolut einerlei war, ob die Muttermilch viel oder wenig Katalase enthielt, und daß sich in dem Befinden der Kinder, in der Gewichtskurve, im Stuhl und im Appetit nicht die geringste

Schwankung zeigte, wenn der Katalasegehalt plötzlich starke Sprünge nach oben oder nach unten machte, vorausgesetzt natürlich, daß sich dabei keine stärkere lokale oder allgemeine Erkrankung der Mutter fand. Fraglich ist natürlich auch noch, ob man aus dem Katalasewerte einfach einen Schluß auf die gesamten anderen Fermente der Milch ziehen darf. Größere Beobachtungsreihen müssen darüber das letzte Urteil fällen. Ganz einwandsfrei ist es jedenfalls nicht, wenn man diesen autochthonen Fermenten einen Einfluß auf die Kinderernährung deswegen zuschreibt, weil — wie dies von italienischer Seite geschehen ist — Säuglinge besser gedeihen sollen, wenn man der Milch die verschiedensten proteolytischen und amylolytischen Fermente zusetzt.

Über den Einfluß von Bitterwässern auf die Magen- und Pankreassaftsekretion.[1])

Von

M. Pewsner-Moskau.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(*Eingegangen am 9. Januar 1907.*)

Im folgenden sollen einige vergleichende Untersuchungen mitgeteilt werden, die über den Einfluß der beiden gebräuchlichsten Bitterwässer, nämlich des Friedrichshaller Bitterwassers und des Hunyadi-Jànos, auf Magen- und Pankreassaftsekretion bei Hunden angestellt worden sind. Bei den Untersuchungen über den Einfluß dieser Mineralwässer auf die Magensaftbildung bedienten wir uns verschiedener Hunde, denen wir einen sog. Magenblindsack nach der Pawlowschen Methode angelegt hatten; den Einfluß auf die Pankreassaftsekretion studierten wir an einem Hunde mit einer Dauerfistel des Pankreas, die gleichfalls nach der Pawlowschen Methode operiert worden war.

Bevor wir auf die Mitteilung unserer Versuche kommen, seien einige Worte über die Zusammensetzung dieser beiden Bitterwässer gesagt.

Friedrichshaller Bitterwasser enthält im wesentlichen schwefelsaures Natron, schwefelsaures Magnesium, Chlornatrium und Chlormagnesium und zwar:

ca. 0,6 % Natr. sulf.
„ 0,6 „ Magn. sulf.
„ 0,5 „ Chlormagnesium
„ 0,7 „ Chlornatrium.

---

[1]) Die Versuche am Magenblindsack wurden teils von Herrn Dr. Schirokauer, teils von Herrn Professor Dr. Bickel angestellt.

Hunyadi-Jànos besteht vor allem aus:

ca. 1,9 % Natr. sulf.
„ 1,8 „ Magn. sulf.
„ 0,1 „ Chlornatrium.

Beide Wässer besitzen etwas freie Kohlensäure.

Über die reinen Salzwirkungen auf Magen- und Pankreassaftbildung ist soviel bekannt, daß Glauber- und Bittersalz die Sekretion hemmen, während das Kochsalz einen die Sekretion befördernden Einfluß ausübt. Der sekretorische Einfluß des Chlormagnesiums ist noch nicht untersucht. Vergleichen wir das Verhältnis der sekretionsbefördernden Salze zu den die Sekretion hemmenden in beiden Wassern, so ergibt sich ungefähr folgendes:

Friedrichshaller Bitterwasser:	1,1 % : 0,7 %	hemmende Salze :
Hunyadi-Jànos:	3,7 „ : 0,1 „	fördernden Salzen.

Man sieht schon bei dieser ganz oberflächlichen Schätzung, daß beide Bitterwässer voraussichtlich nicht den gleichen Einfluß auf die Saftbildung in den beiden wichtigsten Verdauungsorganen, dem Magen und der Pankreasdrüse, haben. Beim Friedrichshaller Mineralwasser halten sich die die Sekretion begünstigenden Bestandteile mit denjenigen, die die Sekretion lähmen, fast die Wagschale, während bei Saxlehners Wasser die letzteren bedeutend die erstgenannten übertreffen.

I. Versuche mit Friedrichshaller Bitterwasser an Magenblindsackhunden.

1. Versuch. Der nüchterne Hund (H.) erhält um 12 Uhr 200 ccm Leitungswasser und eine halbe Stunde später 200 ccm Milch mit der Schlundsonde in den großen Magen eingegossen. Nachdem die Sekretion am kleinen Magen abgelaufen ist, erhält das Tier 200 ccm Friedrichshaller Bitterwasser und eine halbe Stunde später abermals 200 ccm Milch durch die Schlundsonde. Die danach am kleinen Magen sich einstellende Sekretion wird beobachtet.

Zeit						
12^{00}	Uhr	200	ccm	Leitungswasser.		
12^{00}—12^{30}	„	0,3	„	Saft	G.A. —	Gesamte Saftmenge: 6,8 ccm.
12^{30}	„	200	„	Milch		
12^{30}—1^{00}	„	2,6	„	Saft	„ 80	
1^{00}—1^{30}	„	2,1	„	„	„ 80	
1^{30}—2^{00}	„	1,0	„	„	„ 120	
2^{00}—2^{30}	„	0,8	„	„	„ 120	

Zeit:					
2^{30}	Uhr	200	ccm	Friedrichshaller Bitterwasser.	
2^{30}— 3^{00}	„	1,0	„	Saft G.A. 130	Gesamte Saftmenge: 7,3 ccm.
3^{00}	„	200	„	Milch	
3^{00}— 3^{30}	„	2,5	„	Saft „ 120	
3^{30}— 4^{00}	„	2,0	„	„ „ 120	
4^{00}— 4^{30}	„	1,0	„	„ „ 120	
4^{30}— 5^{00}	„	0,8	„	„ „ 120	

Versuch 2. Hund (M.). Versuchsanordnung wie bei Versuch No. 1.

Zeit:					
11^{30}	Uhr	200	ccm	Leitungswasser.	
11^{30}—12^{00}	„	1,2	„	Saft G.A. 60	Gesamte Saftmenge: 14,1 ccm.
12^{00}	„	200	„	Milch	
12^{00}—12^{30}	„	4,9	„	Saft „ 80	
12^{30}— 1^{00}	„	3,0	„	„ „ 140	
1^{00}— 1^{30}	„	2,8	„	„ „ 140	
1^{30}— 2^{00}	„	2,2	„	„ „ 140	
3^{00}	„	200	„	Friedrichshaller Bitterwasser.	
3^{00}— 3^{30}	„	2,3	„	Saft G.A. 140	Gesamte Saftmenge: 17,5 ccm.
3^{30}	„	200	„	Milch	
3^{30}— 4^{00}	„	4,2	„	Saft „ 160	
4^{00}— 4^{30}	„	4,2	„	„ „ 160	
4^{30}— 5^{00}	„	3,5	„	„ „ 160	
5^{00}— 5^{30}	„	3,5	„	„ „ 140	

Versuch 3. Hund (M.) Versuchsanordnung wie bei Versuch No. 1.

Zeit:					
12^{00}	Uhr	200	ccm	Leitungswasser.	
12^{30}— 1^{00}	„	1,2	„	Saft G.A. 80	Gesamte Saftmenge: 7,7 ccm.
1^{00}	„	200	„	Milch	
1^{00}— 1^{30}	„	2,0	„	Saft „ 80	
1^{30}— 2^{00}	„	2,5	„	„ „ 120	
2^{00}— 2^{30}	„	1,0	„	„ „ 140	
2^{30}— 3^{00}	„	1,0	„	„ „ 120	
3^{00}	„	200	„	Friedrichshaller Bitterwasser.	
3^{00}— 3^{30}	„	0,5	„	Saft G.A. —	Gesamte Saftmenge: 12,0 ccm.
3^{30}	„	200	„	Milch	
3^{30}— 4^{00}	„	5,0	„	Saft „ 80	
4^{00}— 4^{30}	„	3,5	„	„ „ 140	
4^{30}— 5^{00}	„	2,0	„	„ „ 140	
5^{00}— 5^{30}	„	1,0	„	„ „ 140	

Diesen Versuchen könnten wir noch weitere mit analogen Resultaten hinzufügen. Die mitgeteilten genügen indessen, um zu zeigen, daß das Friedrichshaller Bitterwasser bei nachträglicher Gabe einer Nahrung auf die Magenschleimhaut einen die Sekretion hemmenden Einfluß nicht ausübt. Folgender Versuch, der einen Vergleich zwischen der sekretorischen Wirkung dieses Mineralwassers und derjenigen des Leitungswassers gestattet, läßt uns vielleicht einen geringfügigen hemmenden Einfluß des Friedrichshaller Bitterwassers erkennen, aber dieser Einfluß, den das Mineralwasser an sich vielleicht besitzt, ist jedenfalls nicht stark genug, um den Sekretionsreiz einer später dargereichten Nahrung zu paralysieren.

Versuch 4. Hund (X).

Zeit		Menge				
Zeit: 11^{30}	Uhr	200	ccm	Leitungswasser.		
11^{30}—12^{00}	„	4,2	„	Saft G.A.	120	Gesamte Saftmenge: 12,6 ccm.
12^{00}—12^{30}	„	4,2	„	„ „	120	
12^{30}— 1^{00}	„	2,6	„	„ „	120	
1^{00}— 1^{30}	„	1,6	„	„ „	120	
1^{30}	„	200	„	Friedrichshaller Bitterwasser.		
1^{30}— 2^{00}	„	3,0	„	Saft G.A.	80	Gesamte Saftmenge: 10,8 ccm.
2^{00}— 2^{30}	„	3,4	„	„ „	70	
2^{30}— 3^{00}	„	2,2	„	„ „	60	
3^{00}— 3^{30}	„	2,2	„	„ „	50	

II. Versuche mit Hunyadi-János an Magenblindsackhunden.

Versuch 5. Hund (L). Versuchsanordnung wie bei Versuch No. 1.

Zeit		Menge				
Zeit: 11^{30}	Uhr	150	ccm	Leitungswasser.		
11^{30}—12^{00}	„	0,8	„	Saft G.A.	—	Gesamte Saftmenge: 12,5 ccm.
12^{00}	„	100	„	Milch		
12^{00}—12^{30}	„	1,0	„	Saft „	65	
12^{30}— 1^{00}	„	2,5	„	„ „	80	
1^{00}— 1^{30}	„	0,8	„	„ „	60	
1^{30}— 2^{00}	„	2,6	„	„ „	65	
2^{00}— 2^{30}	„	2,2	„	„ „	65	
2^{30}— 3^{00}	„	1,6	„	„ „	70	
3^{00}— 3^{30}	„	1,0	„	„ „	65	

Zeit:					
3^{30}	Uhr	150	ccm	Hunyadi-Jànos.	
3^{30}— 4^{00}	„	1,6	„	Saft G.A. 70	Gesamte Saftmenge: 6,6 ccm.
4^{00}	„	100	„	Milch	
4^{00}— 4^{30}	„	1,1	„	Saft „ 70	
4^{30}— 5^{00}	„	1,1	„	„ „ 70	
5^{00}— 5^{30}	„	0,9	„	„ „ 50	
5^{30}— 6^{00}	„	0,9	„	„ „ 50	
6^{00}— 6^{30}	„	0,5	„	„ „ 60	
6^{30}— 7^{00}	„	0,5	„	„ „ 60	
7^{00}— 7^{30}	„	0,0	„	„ „ —	

Versuch 6. Hund (Z). Versuchsanordnung wie bei Versuch No. 1.

Zeit:					
11^{00}	Uhr	200	ccm	Leitungswasser.	
11^{00}—11^{30}	„	1,8	„	Saft G.A. —	Gesamte Saftmenge: 17,5 ccm.
11^{30}	„	250	„	Milch	
11^{30}—12^{00}	„	5,0	„	Saft „ —	
12^{00}—12^{30}	„	4,8	„	„ „ —	
12^{30}— 1^{00}	„	3,1	„	„ „ —	
1^{00}— 1^{30}	„	2,3	„	„ „ —	
1^{30}— 2^{00}	„	0,5	„	„ „ —	
2^{00}	„	200	„	Hunyadi-Jànos.	
2^{00}— 2^{30}	„	1,6	„	Saft G.A. —	Gesamte Saftmenge: 7,8 ccm.
2^{30}	„	250	„	Milch	
2^{30}— 3^{00}	„	0,3	„	Saft „ —	
3^{00}— 3^{30}	„	1,1	„	„ „ —	
3^{30}— 4^{00}	„	2,1	„	„ „ —	
4^{00}— 4^{30}	„	1,1	„	„ „ —	
4^{30}— 5^{00}	„	1,1	„	„ „ —	
5^{00}— 5^{30}	„	0,5	„	„ „ —	

Der hemmende Einfluß des Hunyadi-Jànos ergibt sich auch, wenn man ohne Darreichung von Nahrung das Bitterwasser in seinem sekretorischen Effekt mit Leitungswasser vergleicht.

Versuch 7. Hund (L).

Zeit:					
11^{00}	Uhr	150	ccm	Hunyadi-Jànos.	
11^{00}—11^{30}	„	1,6	„	Saft G.A. 80	Gesamte Saftmenge: 7,4 ccm.
11^{30}—12^{00}	„	0,8	„	„ „ 55	
12^{00}—12^{30}	„	1,6	„	„ „ 85	
12^{30}— 1^{00}	„	2,2	„	„ „ 110	
1^{00}— 1^{30}	„	1,2	„	„ „ 100	

Zeit: 1^{30} Uhr 150 ccm Leitungswasser.

Zeit						Gesamte Saftmenge
1^{30}—2^{00}	„	1,8	„	Saft G.A.	90	Gesamte Saftmenge: 10,7 ccm.
2^{00}—2^{30}	„	2,6	„	„ „	90	
2^{30}—3^{00}	„	2,4	„	„ „	85	
3^{00}—3^{30}	„	1,7	„	„ „	85	
3^{30}—4^{00}	„	1,3	„	„ „	75	
4^{00}—4^{30}	„	0,9	„	„ „	70	

III. Vergleichende Versuche über den Einfluß von Friedrichshaller Bitterwasser und Hunyadi-Jànos auf die Magensaftsekretion.

Um an ein und demselben Tiere Vergleichswerte über den Einfluß der beiden Mineralwässer auf die Magensaftsekretion zu gewinnen, haben wir weiterhin noch folgende Versuche angestellt.

Versuch 8. Hund (M.). Versuchsanordnung wie Versuch Nr. 1.

Zeit: 9^{30} Uhr 200 ccm Hunyadi-Jànos.

Zeit						Gesamte Saftmenge
9^{30}—10^{00}	„	0,0	„	Saft. G.A.	—	Gesamte Saftmenge 6,5 ccm.
10^{00}	„	200	„	Milch.		
10^{00}—10^{30}	„	0,0	„	Saft. G.A.	—	
10^{30}—11^{00}	„	0,6	„	„ „	—	
11^{00}—11^{30}	„	2,7	„	„ „	120	
11^{30}—12^{00}	„	2,0	„	„ „	120	
12^{00}—12^{30}	„	0,7	„	„ „	—	
12^{30}—1^{00}	„	0,5	„	„ „	—	

1^{00} Uhr 200 ccm Friedrichshaller Bitterwasser.

Zeit						Gesamte Saftmenge
1^{00}—1^{30}	„	1,0	„	Saft. G.A.	—	Gesamte Saftmenge 14,2 ccm.
1^{30}	„	200 ccm		Milch.		
1^{30}—2^{00}	„	2,5	„	Saft. G.A.	120	
2^{00}—2^{30}	„	3,3	„	„ „	100	
2^{30}—3^{00}	„	2,6	„	„ „	120	
3^{00}—3^{30}	„	1,8	„	„ „	120	
3^{30}—4^{00}	„	0,9	„	„ „	100	
4^{00}—4^{30}	„	1,5	„	„ „	120	
4^{30}—5^{00}	„	0,6	„	„ „	—	

Bei diesem Versuche war von allen, die ich in solcher Art anstellte, die Differenz zwischen den nach den beiden Mineralwässern abgeschiedenen Magensaftmengen am größten. Aber auch in den Fällen, in denen der Unterschied nicht so eklatant, wie hier, war,

kam es zum Ausdruck, daß das Hunyadi-Jànos eine viel deutlichere Tendenz hat, die Magensaftbildung herabzusetzen, als das Friedrichshaller Bitterwasser.

Wir führen noch folgenden Versuch an.

Versuch 9. Hund (H.). Versuchsanordnung wie bei Versuch Nr. 1.

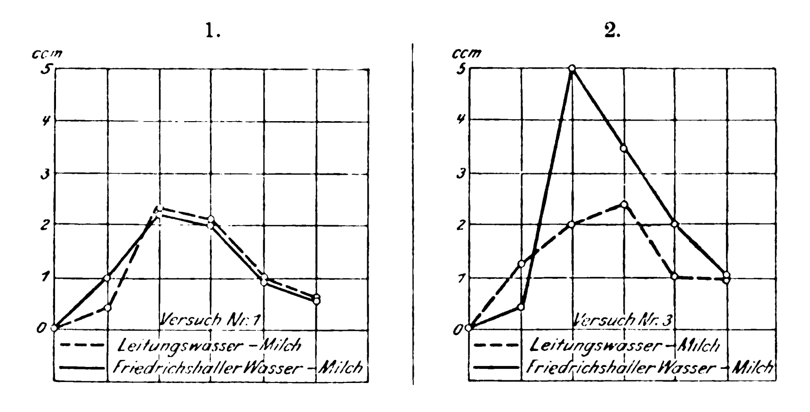
Zeit: 11^{30} Uhr 200 ccm Hunyadi-Jànos.

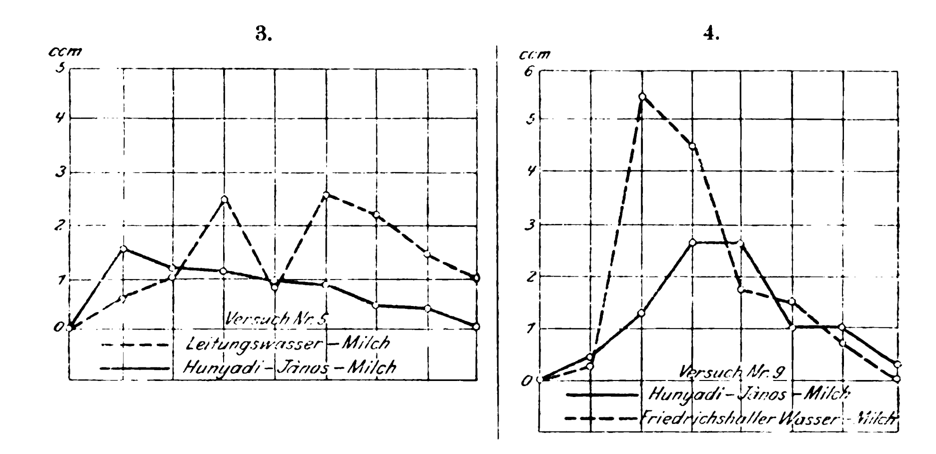
11^{30}—12^{00}	„ 0,5	„ Saft. G.A.	—	Gesamte Saftmenge 9,5 ccm.
12^{00}	„ 200	„ Milch.		
12^{00}—12^{30}	„ 1,3	„ Saft. G.A.	100	
12^{30}— 1^{00}	„ 2,7	„ „ „	120	
1^{00}— 1^{30}	„ 2,7	„ „ „	120	
1^{30}— 2^{00}	„ 1,0	„ „ „	120	
2^{00}— 2^{30}	„ 1,0	„ „ „	120	
2^{30}— 3^{00}	„ 0,3	„ „ „	—	

3^{00} Uhr 200 cm Friedrichshaller Bitterwasser.

3^{00}— 3^{30}	„ 0,3	„ Saft. G.A.	=	Gesamte Saftmenge: 14,6 ccm.
3^{30}	„ 200	„ Milch.		
3^{30}— 4^{00}	„ 5,4	„ Saft. G.A.	140	
4^{00}— 4^{30}	„ 4,6	„ „ „	140	
4^{30}— 5^{00}	„ 1,8	„ „ „	140	
5^{00}— 5^{30}	„ 1,7	„ „ „	140	
5^{30}— 6^{00}	„ 0,8	„ „ „	120	

Die nachstehenden Kurven bringen die Resultate der vorstehenden Untersuchungen graphisch zur Darstellung.





IV. Versuche über den Einfluß der beiden Bitterwässer auf die Pankreassaftsekretion an einem Hunde mit permanenter Fistel des Pankreasausführungsganges.

Die Versuchsanordnung war analog derjenigen, die wir bei den Versuchen an den Magenblindsackhunden beobachtet hatten. Das nüchterne Tier erhielt 200 ccm Leitungswasser, dann wurde der Pankreassaft in Zehnminutenportionen während einer Stunde aufgefangen, darauf bekam der Hund 200 ccm Milch und wieder wurde der Pankreassaft in Zehnminutenportionen eine Stunde lang gesammelt. Im Anschluß daran erhielt das Tier in den nämlichen Abständen das zu untersuchende Bitterwasser und Milch in denselben Quantitäten.

Wir teilen folgende Versuche mit.

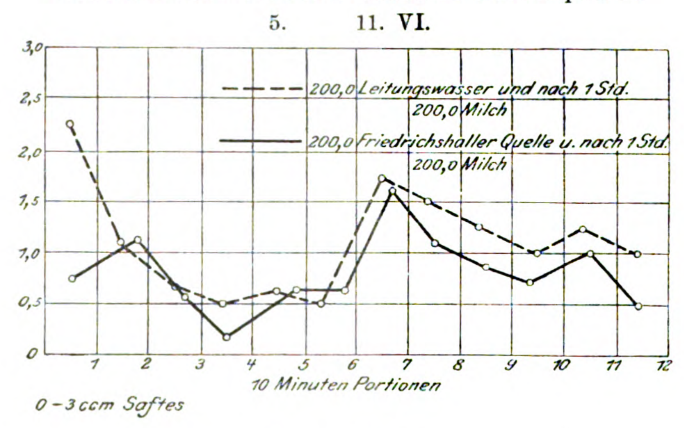
Versuche mit Friedrichshaller Bitterquelle.

11. VI. / Minuten	I. Stunde 200,0 Wasser	II. Stunde 200,0 Milch	III. Stunde 200,0 Friedrichshaller Quelle	IV. Stunde 200,0 Milch	
1—10	2,2	1,7	0,8	1,6	Menge des Pankreassaftes in je 10′
10—20	1,1	1,5	1,1	1,1	
20—30	0,7	1,4	0,7	0,9	
30—40	0,5	1,0	0,3	0,8	
40—50	0,6	1,3	0,6	1,0	
50—60	0,5	1,1	0,2	0,5	
	5,6	8,0	4,1	3,9	Gesamtmenge in einer Stunde.

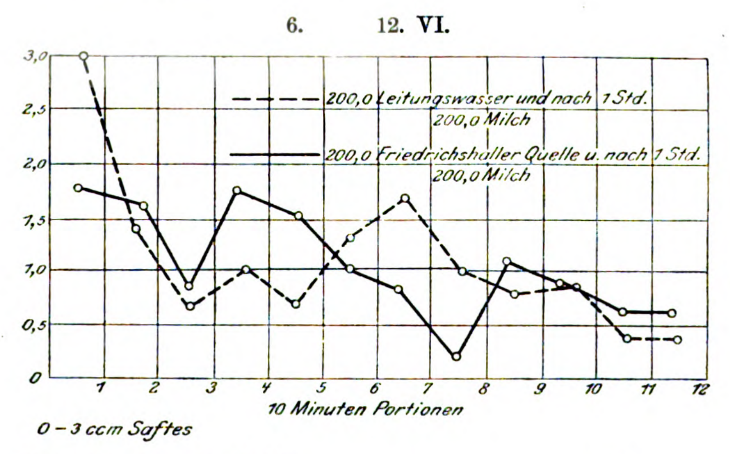
12. VI. / Minuten	I. Stunde 200,0 Wasser	II. Stunde 200,0 Milch	III. Stunde 200,0 Friedrichshaller Quelle	IV. Stunde 200,0 Milch	
1—10	3,0	1,7	1,8	0,8	Menge des Pankreassaftes in je 10′
10—20	1,4	1,0	1,7	0,2	
20—30	0,7	0,8	0,8	1,1	
30—40	1,0	0,8	1,8	0,9	
40—50	0,8	0,4	1,5	0,6	
50—60	1,4	0,4	1,0	0,6	
	8,3	5,1	8,6	4,2	Gesamtmenge in einer Stunde.

Versuche mit Friedrichshaller Bitterquelle.

5. 11. VI.



6. 12. VI.



Versuche mit Hunyadi-Jànos.

6. VI. 1906 / Minuten	I. Stunde 200,0 Leitungs-wasser	II. Stunde 200,0 Milch	III. Stunde 200,0 Hunyadi-Jànos	IV. Stunde 200,0 Milch	
1—10	2,0	2,3	1,2	1,7	Menge des Saftes in je 10′.
10—20	3,5	2,3	1,1	1,2	
20—30	3,6	2,3	0,9	3,0	
30—40	6,3	4,1	1,0	1,3	
40—50	3,4	2,3	1,5	1,4	
50—60	1,5	1,6	2,1	0,5	
	20,3	14,9	7,8	9,1	Gesamtmenge in jeder Stunde.

7. VI. / Minuten	I. Stunde 200,0 Leitungs-wasser	II. Stunde 200,0 Milch	III. Stunde 200,0 Hunyadi-Jànos	IV. Stunde 200,0 Milch	
1—10	2,4	1,7	0,9	1,8	10 Minuten-Portionen.
10—20	4,0	1,4	1,0	1,1	
20—30	2,0	1,7	0,9	0,9	
30—40	1,2	2,4	1,3	1,2	
40—50	0,7	1,5	1,8	1,5	
50—60	0,1	1,0	2,0	1,0	
	10,4	9,7	7,9	7,5	Gesamtmenge in jeder Stunde.

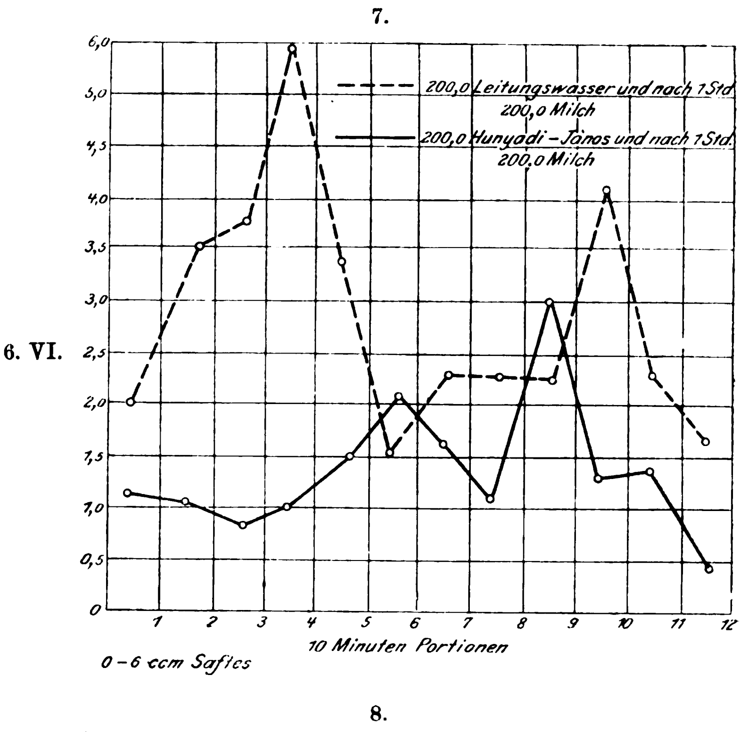
Auch diese Versuche lehren, daß das Friedrichshaller Bitterwasser die Pankreassaftsekretion weniger hemmt als Hunyadi-Jànos.

Aus allem ergibt sich, daß sich die Vermutung, die wir eingangs auf Grund unserer Berechnung aus den Analysen der beiden Bitterwässer ausgesprochen haben, durchaus als zutreffend erwiesen hat.

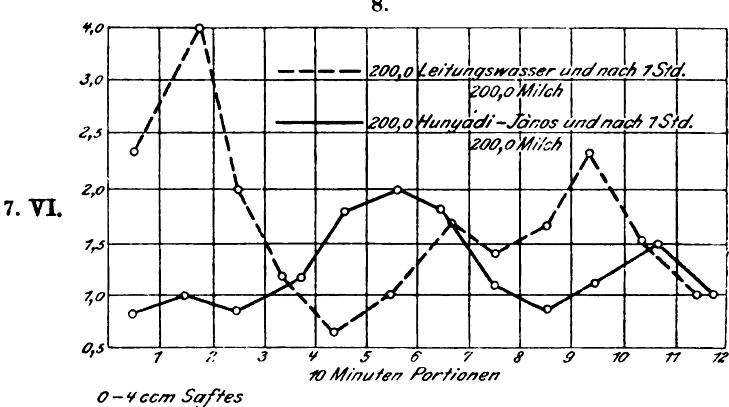
Es ist einleuchtend, daß die Ergebnisse dieser Versuche wohl geeignet sind, die Indikationen für die Medikation der beiden von uns untersuchten Bitterwässer präziser stellen zu lassen, als es bisher möglich war. Beiden Bitterwässern gemeinsam ist die abführende Wirkung, kleine Gaben machen die Darmentleerungen breiig, große rufen Diarrhöen hervor. Hunyadi-Jànos übt gleichzeitig einen lähmenden Einfluß auf die wichtigsten Verdauungsdrüsen: die

Versuche mit Hunyadi-Jànos.

7.



8.



Magenschleimhaut und das Pankreas; das Friedrichshaller Bitterwasser läßt diese Wirkung mehr weniger vollständig vermissen. Man wird so das Friedrichshaller Bitterwasser als das mildere der beiden bezeichnen müssen.

Es kommt darauf an, was man durch die Gabe eines Bitterwassers erreichen will; danach richtet sich die Wahl. Wenn man heute vielleicht mehr als früher alle stark differenten Medikationen bei der Behandlung der Magen-Darmkrankheiten möglichst zu vermeiden sucht, so wird man aus dem Grunde künftig vielleicht häufiger das Friedrichshaller Wasser verordnen, wo man bislang das Saxlehner Bitterwasser gab. Beabsichtigt man jedoch eine Herabsetzung in der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen neben den anderen Wirkungen zu erzielen, so ist das letztere Mineralwasser angezeigt.

Im Hinblick auf die Arbeiten von Mosler[1]), v. Mering[2]) und besonders von Vahlen[3]) über den Einfluß des Friedrichshaller Bitterwassers auf den Stoffwechsel, bez. auf die Ausnutzung der Nahrung im Verdauungskanal scheinen mir vergleichende Untersuchungen wünschenswert, die dartun sollen, ob sich auch in dieser Hinsicht ein Unterschied zwischen den beiden von uns untersuchten Mineralwässern auffinden läßt.

---

1) Mosler, Über die Wirkung des Friedrichshaller Bitterwassers. **1860**. Referat.

2) v. Mering, Berl. klin. Wochenschr. **1880**.

3) Vahlen, Therapeutische Monatshefte **1898**. Weitere Literatur siehe: A. Bickel, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Mineralwässer auf die sekretorische Magenfunktion. Berl. klin. Wochenschrift **1906**. — A. Bickel, Experimentelle und klinische Untersuchungen zur normalen und pathologischen Physiologie der Saftbildung im Magen und zur Therapie seiner Sekretionsstörungen. Arbeiten aus dem path. Institut zu Berlin **1906**. — K. Sasaki, Kasuistischer Beitrag zur vergleichenden Untersuchung des Einflusses verschiedener Mineralwässer auf die Magensaftsekretion. Arch. für Verdauungskrankheiten **12**, H. 3. — F. Heinsheimer, Das Experiment in der Balneotherapie. Berl. klin. Wochenschr. **1906**.

Die Formulierung der Präzipitinreaktion nach Hamburger und Arrhenius.

Von

Paul Fleischmann und **Leonor Michaelis.**

(Aus der ersten medizinischen Klinik der Charité.)

(Eingegangen am 26. Januar 1907.)

Bekanntlich hat Arrhenius im Verein mit mehreren Mitarbeitern, an erster Stelle Torvald Madsen, versucht, unter Zugrundelegung des Guldberg-Waageschen Massenwirkungsgesetzes die quantitativen Verhältnisse der Immunkörperreaktionen einer rechnerischen Analyse zu unterziehen. Beschäftigen wir uns heute einmal mit seinen Ausführungen über die Agglutination und zweitens über die Präzipitation. Da nämlich diese beiden Erscheinungen ihrem Wesen nach so gut wie identisch sind, so wäre zu erwarten, daß für beide dieselben Bindungsgesetze gelten. Das ist aber nach Arrhenius nicht der Fall.

1. Aus früheren Untersuchungen, insbesondere von Eisenberg und Volk, war hervorgegangen, daß eine gegebene Menge agglutinabler Bakterien aus einer Agglutininlösung nicht das gesamte Agglutinin an sich reißt, sondern einen Teil in Lösung läßt; daß sich also ein Gleichgewichtszustand zwischen freiem uud gebundenem Agglutinin herstellt. Damit in Zusammenhang steht die Tatsache, daß eine gegebene Menge von Bakterienleibern nicht nur die zu ihrer Agglutination eben erforderliche Menge Agglutinin zu binden imstande ist, sondern je nach den Umständen, außerordentlich hohe Multipla dieser „einfach agglutinierenden Dosis“.

Soweit standen die Dinge vor dem Eingreifen von Arrhenius in die „Immunochemie“. Was Arrhenius hinzugegeben hat, läßt sich so ausdrücken: die dritte Potenz der gebun-

denen Agglutininmenge steht mit dem Quadrat der freien Agglutininmenge in einem konstanten Verhältnis.

2. Für die Präzipitine waren vor Arrhenius folgende Regeln durch die Arbeiten verschiedener Autoren sicher gestellt:

a) Bei gegebener Menge präzipitabler Substanz wächst die Menge des Präzipitats mit steigendem Präzipitingehalt.

b) Bei gegebener Menge Präzipitin wächst die Menge des Präzipitats mit steigender Menge präzipitabler Substanz zunächst, dann fällt sie wieder, und von einem gewissen Überschuß an präzipitabler Substanz an ist das Präzipitat gleich Null.

c) Bei konstanter Menge von Präzipitin und präzipitabler Substanz nimmt die Menge des Präzipitats um so mehr ab, in einem je größeren Flüssigkeitsvolumen jene miteinander reagieren.

J. Hamburger und Arrhenius haben auch diese Gesetze quantitativ zu formulieren gesucht, indem sie sich zur Messung des Präzipitats einer von J. Hamburger[1]) angegebenen Methode bedienten, welche darauf beruht, daß das Präzipitat bis zu konstantem Volumen in kalibrierten Kapillaren zusammenzentrifugiert wird.

Hamburger und Arrhenius legen nun ihrem mathematischen Ansatz folgende Annahmen zugrunde:

a) Ein Äquivalent des Präzipitats besteht aus 1 Äquivalent Präzipitin + 1 Äquivalent präzipitabler Substanz.

b) Was hier zunächst nicht in Betracht kommt, die lösliche Verbindung von Präzipitin mit präzipitabler Substanz (vgl. 2b) besteht aus 1 Äquivalent Präzipitin + 2 Äquivalenten präzipitabler Substanz.

Sie nehmen also an, daß die Verbindung (Präzipitin + präzipitable Substanz) eine konstante Znsammensetzung hat, so daß man sagen kann, eine gewisse Menge der einen Substanz sei „äquivalent" einer gegebenen Menge der anderen.

Diese Annahme ist nun für Hamburger und Arrhenius so selbstverständlich, daß sie gar nicht näher darauf eingehen; deshalb glauben sie sich auch ohne weiteres berechtigt, unter P in ihrer Formel einmal die in einer gegebenen Präzipitatmenge enthaltene Menge präzipitabler Substanz, und ein zweites Mal die in der gleichen Niederschlagsmenge enthaltene, jener äquivalente Menge Präzipitin zu bezeichnen.

[1]) Fol. haematol. **1905**, 534.

Die Annahme, daß in dem Niederschlag Präzipitin und präzipitable Substanz stets in dem gleichen Mengenverhältnis stehen, ebenso wie in der Verbindung $CaCO_3$ die Menge des Ca zu der des CO_3 stets in dem gleichen Mengenverhältnis steht, wird also von Hamburger und Arrhenius nicht direkt bewiesen, sondern nur indirekt, dadurch, daß die auf Grund dieser Annahme berechneten Werte mit den gefundenen gut übereinstimmen. Und man muß in der Tat zugeben, daß dies in so hohem Maße der Fall ist, daß man es in Anbetracht der schwierigen Methodik gar nicht genauer verlangen kann.

Aber ein richtiges Resultat kann sich auch aus unzutreffenden Voraussetzungen ergeben. Es läßt sich nämlich direkt beweisen, daß in verschiedenen Präzipitaten das Mengenverhältnis von Präzipitin zur präzipitablen Substanz durchaus nicht stets das gleiche ist.

Das ist nicht neu. Schon v. Dungern[1]) hat einmal nachgewiesen, daß ein Präzipitat noch große Menge Präzipitin binden kann; wenn nämlich ein Präzipitat mit einem Minimum von Präzipitin erzeugt worden ist, so absorbiert das Präzipitat noch reichlich neu zugesetztes Präzipitin; entspricht diese Tatsache doch ganz der für Agglutinine (und Ambozeptoren) längst bekannten, daß nämlich eine gegebene Menge Blutkörperchen bezw. Bakterien nicht nur die zur Agglutination (bezw. Lösung) gerade ausreichende Menge, sondern unter Umständen hohe Multipla derselben binden kann. Und bei der nahen Verwandtschaft, ja man kann sagen, prinzipiellen Identität der Agglutinine und Präzipitine ist anzunehmen, daß für beide dieselben Bindungsgesetze gelten werden. Für die Präzipitine würde dieses Gesetz also lauten: Die in einer bestimmten Präzipitatmenge enthaltene Menge präzipitabler Substanz kann nicht nur die zu ihrer Ausfällung eben notwendige Menge Präzipitin binden, sondern je nach Umständen verschiedene Multipla derselben.

Dieses bewiesen wir experimentell auf folgendem Wege:

Als Präzipitin diente das Serum eines lange Zeit mit Rinderserum vorbehandelten Kaninchens, als präzipitable Substanz Rinderserum. Es wurden nun 5 ccm Präzipitin mit 3 ccm (also ziemlich viel!) unverdünnter präzipitabler Substanz versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde nach 5 Stunden scharf abzentrifugiert und dann noch fünf Mal mit 0,85 %iger ClNa-Lösung in der

[1]) Centralbl. f. Bakt. 34, 4. 1903.

Zentrifuge gewaschen, zum Schluß in 2 ccm ClNa-Lösung aufgeschwemmt. (Dieses Auswaschen vermindert die Menge des Niederschlags um eine Spur, weil der Niederschlag nicht völlig unlöslich ist, der Niederschlag kann aber, wofern die Hamburger-Arrheniussche Annahme auch nur annähernd zutrifft, sich in seiner Zusammensetzung nicht ändern, ebenso wenig, wie $CaCO_3$ durch Waschen mit Wasser in seiner Zusammensetzung nicht geändert wird). Diese Aufschwemmung des Niederschlags wurde nun nochmals mit Präzipitin versetzt. Schon ohne weitere Messung sah man, daß die Menge des Niederschlags sich erheblich vermehrte, daß also von dem neu zugesetzten Präzipitin eine merkliche Menge an den Niederschlag gebunden sein mußte. Um dies exakt nachzuweisen, wurde der Niederschlag nach 5 Stunden abzentrifugiert und der Präzipitingehalt der überstehenden Flüssigkeit geprüft im Vergleich zu dem Präzipitingehalt eines Präzipitinserums, welches genau in die gleiche Verdünnung gebracht wurde wie jenes, nur daß es nicht mit einem Präzipitat vorher in Berührung gebracht wurde. Das Kontrollpräzipitin, in einer Menge von 0,3 ccm mit wechselnden Mengen präzipitabler Substanz in Berührung gebracht, gab folgende Werte:

Präzipitin genau nach Berechnung verdünnt	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
präz. Subst. in Verdünn.	$(\frac{1}{10})$ 0,3	$(\frac{1}{25})$ 0,3	$(\frac{1}{50})$ 0,3	$(\frac{1}{100})$ 0,3	$(\frac{1}{250})$ 0,3	$(\frac{1}{500})$ 0,3	$(\frac{1}{1000})$ 0,3
Präzipitat:	+	++	+++	++++	+++	++	+

Ein genau gleicher Versuch, nur daß statt des unveränderten Präzipitins das mit dem Niederschlag in Berührung gewesene Präzipitat verwendet wurde, ergab:

Präzipitat:	0	0	0	0	0	0	

Es ist also von dem Niederschlag soviel Präzipitin gebunden worden, daß die zurückgebliebene Menge Präzipitin überhaupt unter die Schwelle der Nachweisbarkeit fällt.

Da nun das Präzipitat vor und nach dem Zusatz des zweiten Präzipitins die gleiche Menge präzipitabler Substanz in sich schloß, so ist damit bewiesen, daß diese Menge sich mit wechselnden Mengen Präzipitin zu einem Präzipitat vereinigen kann.

Daß aus dem neu zugesetzten Präzipitin sehr erhebliche Sub-

stanzmengen in den Niederschlag einbezogen worden sind, sieht man schon daran, daß die Menge des Niederschlags nach dem erneuten Präzipitinzusatz sichtlich erheblich zunimmt.

Für jeden, der selbst praktisch mit Präzipitinen gearbeitet hat, muß die Annahme, es binde sich immer je 1 Äquivalent der Komponenten zum Niederschlag, äußerst unwahrscheinlich erscheinen. Quantitäten von präzipitabler Substanz, welche durch Eiweißreagentien eigentlich kaum noch nachweisbar sind, erzeugen mit reichlichem Präzipitin noch recht massige Niederschläge, sodaß es ganz zweifellos ist, daß beim Zusammentreffen von viel Präzipitin mit wenig präzipitabler Substanz die Hauptmasse des Niederschlags aus dem Präzipitin und nur sehr wenig aus der präzipitablen Substanz stammt. Diese Tatsache ist den Fachgenossen so geläufig, daß man verschiedenerseits versucht hat, das Wesen der Präzipitinreaktion auf Grund derselben umzudeuten; so nimmt z. B. Moll[1]) an der Bezeichnung „präzipitable Substanz" Anstoß, weil diejenige Substanz, welche die Hauptmasse des Niederschlags liefere, gar nicht sie, sondern das „Präzipitin" sei; so deuten Friedemann und Friedenthal[2]) die Präzipitin-Reaktion derart, daß die präzipitable Substanz überhaupt nicht direkt an der Niederschlagsbildung beteiligt sei, sondern nur indirekt dadurch, daß sie eine Hemmung beseitige, die sonst das Entstehen des Niederschlags in dem Präzipitinserum verhindere. Wir haben nicht die Absicht, die Richtigkeit solcher Anschauungen hier zu vertreten; wir erwähnen sie nur, um zu zeigen, daß erfahrenen Arbeitern niemals der Gedanke an eine chemische Äquivalenz der Mengen der beiden Komponenten im Präzipität kommen kann. In Wahrheit ist es eben weder so, wie z. B. Friedemann und Friedenthal annehmen, daß das Präzipitat der Masse nach ganz aus dem Präzipitin stamme, noch so, wie Hamburger und Arrhenius annehmen, daß beide Komponenten in einem konstanten Mengenverhältnis in dem Niederschlag zusammentreten; vielmehr enthält ein Niederschlag, der aus sehr wenig präzipitabler Substanz und sehr viel Präzipitin entsteht, der Hauptmenge nach fast nur Präzipitin, dagegen enthält ein Niederschlag, der aus mittleren Mengen beider Komponenten entsteht, auch beide Komponenten in mehr oder weniger gleicher Verteilung.

---

[1]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog. 4, 578.

[2]) Ztschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 3, 73. 1906.

Es geht hier, wie so oft bei der gegenseitigen Ausflockung zweier kolloidal gelöster Substanzen, der Niederschlag hat eben nicht eine für alle Bedingungen geltende, konstante Zusammensetzung, und es gibt nicht eine bestimmte Menge Präzipitin, welches unter allen Bedingungen einer gegebenen Menge präzipitabler Substanz „äquivalent" ist.

Die Ursache hierfür ist offenbar die kolloidale Beschaffenheit der Lösungen; die Zerteilung der gelösten Substanz geht nicht bis in molekulare Dimensionen, sondern ist wenigstens zum Teil gröber und je nach den Umständen von wechselnder Grobheit oder Feinheit.

Stöchiometrische Messungen führen bei wirklich gelösten Körpern zur Aufstellung der Äquivalentgewichte, weil die Zerteilung des gelösten Stoffs stets die gleiche ist, nämlich die molekulare; ein Molekül ist äquivalent einem anderen; aber bei Kolloiden kann höchstens ein Kolloidkorn einem anderen äquivalent sein. Vor kurzem haben Michaelis und Pincussohn[1]) sich bemüht, eine Äquivalenz zwischen dem Mastixkorn und dem Indophenolkorn nachzuweisen, indem sie zeigten, daß je ein Mastixkorn mit je einem Indophenolkorn zu einer Verbindung zusammentritt. Aber diese Äquivalenz bezieht sich nur auf das jeweilig vorhandene Korn, welches mit der Molekulargröße der zerteilten Substanz gar nichts zu tun hat, sondern willkürlich größer oder kleiner gemacht werden kann.

Nun muß allerdings zugegeben werden, daß die bei reinen Suspensionskolloiden[2]) gefundenen Gesetze nicht in genau derselben Form bei hydrophilen Kolloiden, wie es die Eiweißkörper und die Antikörper sind, gelten können. Diese müssen wohl eine Mittelstellung zwischen echten Lösungen und Suspensionen einnehmen. Eine klare Vorstellung über die Bindungsgesetze der hydrophilen Kolloide läßt sich zurzeit noch nicht geben. Jedenfalls steht das eine fest, daß die bei der Bindung zweier hydrophilen Kolloide einander bindenden „Äquivalente" keine unabänderlichen Massengrößen, wie die Moleküle der wirklich gelösten Körper, darstellen.

---

[1]) Biochem. Ztschr. 2, 251.

[2]) Vergl. Höber, Die physik. Chem. der Zelle und der Gewebe 2. Aufl., S. 208.

Über Opiumtoxine.

Von

Dr. Wolfgang Weichardt und **Dr. Hermann Stadlinger,**

Privatdozent a. d. K. Universität. 1. Assistent der K. Untersuchungsanstalt.

(Aus dem hygienisch-bakteriolog. Institut und der Untersuchungsanstalt der Universität Erlangen.)

(Eingegangen am 26. Januar 1907.)

Wie an anderer Stelle beschrieben, gelang es Weichardt[1]) aus den Muskeln hoch ermüdeter Tiere nach Entfernung der dialysablen Bestandteile und fraktionierter Fällung indifferenter Eiweiße ein echtes Toxin zu isolieren.

Bekanntlich versteht die Immunitätsforschung unter echten Toxinen Substanzen, die im Organismus spezifische Antikörperbildung anzuregen imstande sind.

Weichardt zeigte fernerhin[2]), daß das gut charakterisierte Ermüdungstoxin auch durch chemische oder physikalische Erschütterung von Eiweiß bei einer Temperatur von nicht über 40° hergestellt werden kann. Dann wurde von ihm gefunden, daß das Ermüdungstoxin in dem Tierreiche, aber auch in der Pflanzenwelt verbreitet ist, so als Teilgift bekannter Bakterienendotoxine.

Das Ermüdungstoxin ist, wie früher gezeigt werden konnte[3]), vermöge seines Antigencharakters imstande, in geringer, die Zellen nicht schädigender Menge einverleibt, bei Mäusen nach einer ge-

---

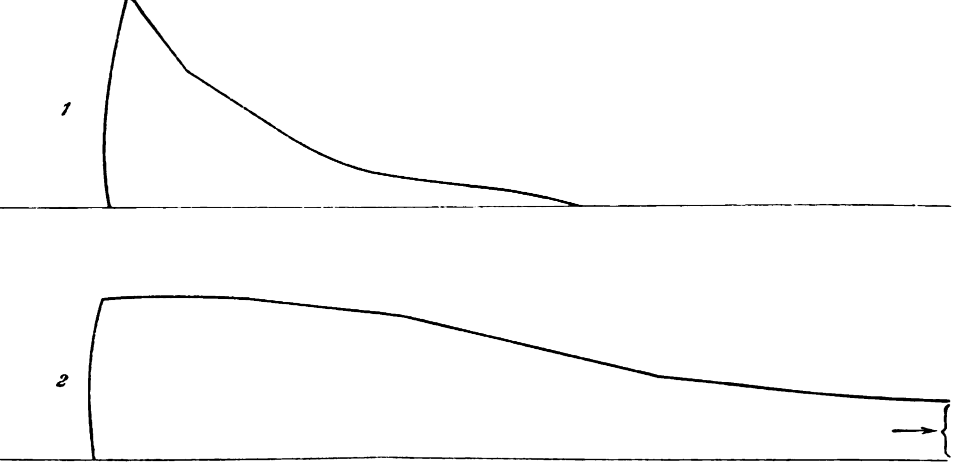
[1]) Weichardt, Serologische Studien aus dem Gebiete der exp. Therap. Stuttgart, Ferd. Enke **1906**.

[2]) Über Ermüdungstoxin und dessen Hemmungskörper. Med. Klinik **1906**, Nr. 44.

[3]) Studien über einen neuen Hemmungskörper. Münchner med. Wochenschr. **1906**, Nr. 35.

wissen Latenzzeit aktive Immunität hervorzubringen. Diese äußert sich in einer Erhöhung der Endwerte bei Kymographionkurven von Gastrocnemiuszuckungen[1]).

Folgende Kurven sind nach einer schon früher beschriebenen Technik geschrieben und zeigen erstens die Leistung einer Normalmaus und zweitens die einer mit kleinen Dosen Ermüdungstoxin aktiv immunisierten.



1. Ermüdungskurve einer 15 g schweren Normalmaus.
2 Ermüdungskurve einer gleich großen mit geringer Menge Ermüdungstoxins aktiv immunisierten Maus, unter gleichen Bedingungen geschrieben.

Technik: s. serolog. Studien aus dem Gebiete der exp. Therap. Stuttgart Ferd. Enke 1906. (Lit. 1.)

Die Kurven sind nicht vollständig ausgeschrieben, sondern die Spitzen der durch kurzdauernde Tetani hervorgerufenen Zuckungshöhen sind durch die Kurvenlinie verbunden.

Reizung der Maus *1* maximal. Bei Maus *2* war der Rollenabstand gleich dem bei Maus *1*.

Das Aufsuchen neuer Fundorte von Eiweißabspaltungsantigenen mit Ermüdungstoxincharakter, insbesondere die Vermutung, ein Teil der komplexen Wirkung des Opiums könnte durch derartige Stoffe bedingt sein, führte zu vorliegender Arbeit.

Bekanntlich sind die im Handel befindlichen Opiumsorten durch einen nicht geringen Gehalt an Eiweißstoffen ausgezeichnet; es dürfte deshalb das Vorkommen von echten Toxinen mit Antigen-

---

[1]) Über Ermüdungstoxin und dessen Antitoxin. Münchner med. Wochenschr. **1904**, Nr. 48.

charakter im Opium an und für sich durchaus nicht befremdlich scheinen.

Zu den Grundbedingungen für die Herstellung guten Opiumreintoxins gehört:

1. Anwendung quantitativ fällender Alkaloidreagentien. (Ein Überschuß derselben muß leicht wieder aus den Opiumauszügen entfernbar sein);
2. Vermeidung von Alkalien, Schwefelwasserstoff und andauernd stark erhöhten Temperaturen;
3. Völlige Entfernung aller in Lösung befindlichen Salze durch rasche Dialyse.

Diese wenigen Momente dürften einen Fingerzeig dafür geben, daß von den schönen Hilfsmitteln der angewandten Alkaloidchemie im allgemeinen hier recht wenig Gebrauch gemacht werden kann.

Es ist geradezu als ein glücklicher Umstand zu bezeichnen, daß dem Ermüdungstoxin ein überaus geringer Grad von Dialysierbarkeit zukommt; denn nur durch die Dialyse wird es möglich, eine Trennung von den anhaftenden Salzen, die oft recht unangenehme biologische Nebenwirkungen auslösen, zu bewirken. Freilich darf die Menge der zu entfernenden Stoffe nicht so groß sein, daß die zur Dialyse nötige Zeit ungewöhnlich lang wird, da alsdann die Gefahr der bakteriellen Infektion wächst.

Wir sehen also, daß bei der Verwendung des Alkaloidfällungsmittels nicht nur die Art desselben, sondern auch die Menge eine wichtige Rolle spielt. Sparsame Verwendung der Alkaloidreagentien ist daher eine weitere Bedingung für die Herstellung reiner Toxinlösungen.

1. Bei den ersten Versuchen wurde auf die Anwendung der Alkaloidfällungsmittel noch verzichtet und die Entfernung der weniger hochmolekularen Bestandteile des Opiums der Dialyse allein überlassen. Indessen zog sich diese derart in die Länge, daß die Methode verlassen wurde, obschon die Anwesenheit des Toxins zu erkennen war, denn die mit Antitoxin vorher gefütterten Mäuse zeigten nach Injektion des filtrierten Dialysatorinhaltes keine Ermüdung, während die nicht gefütterten, sonst ebenso behandelten schwer ermüdeten, ev. auch starben.

2. Bei unserer zweiten Versuchsreihe wurden Bleiessig und Gerbsäure verwendet.

Konzentrierte, kalt bereitete und filtrierte Opiumauszüge wurden zunächst tropfenweise unter starkem Schütteln mit soviel verdünntem Ammoniak (1 : 10) versetzt, daß die nun stark getrübte, vorher saure Flüssigkeit neutrale Reaktion zeigte. Nach einigem Stehen und anschließender Filtration wurde dem Filtrat soviel Bleiessig (basisches Bleiacetat) zugefügt, bis nach weiterem Zusatze des Fällungsmittels kein Niederschlag mehr entstand; dann wurde wiederum filtriert.

Es war nun unsere nächste Aufgabe, aus dem Filtrate den Überschuß von Blei zu entfernen. Die naheliegende Anwendung des Schwefelwasserstoffes mußte, wie schon erwähnt, unterbleiben, da nach unseren Beobachtungen H_2S geeignet ist, aus Eiweißlösungen toxische Stoffe abzuspalten. Obschon mit dem Zusatz von sekundärem Natriumphosphat (konz. Lösung) eine Vermehrung der später zu dialysierenden Salze eintritt, so mußten wir doch zu diesem Bleifällungsmittel greifen. Das entbleite Filtrat wurde nun mit Gerbsäure im Überschuß weiter behandelt (Lösung von 40 g Gerbsäure und 100 g Wasser), alsdann einige Zeit der Ruhe überlassen. Nach erfolgter Filtration war aus dem Filtrate der Überschuß an Gerbsäure zu entfernen, wozu sich das schon vorher benützte basische Bleiacetat am geeignetsten erwies. Daß der zuletzt entstandene Bleiüberschuß wiederum durch Natriumphosphat beseitigt werden mußte, ergibt sich von selbst. So entstanden schließlich wasserhelle und alkalisch reagierende Filtrate, die neben dem Eiweißabspaltungsantigen reichliche Mengen von Natriumacetat und Natriumphosphat enthielten. Dieselben wurden entweder unmittelbar dialysiert oder einer Konzentration im Vakuum bei 30 ° C. unterworfen. Sehr zweckmäßig erwies sich für den letztgenannten Fall ein vorheriger Salzsäurezusatz bis zur schwach sauren Reaktion, da sich unsere Antigene in saurer Lösung erhöhten Temperaturen gegenüber ziemlich resistent erwiesen. Sobald der Inhalt des Vakuum die Konsistenz eines dicken Sirups angenommen hatte, wurde ihm tropfenweise unter Umrühren konzentrierte Natronlauge zugesetzt, jedoch nur soviel, daß eben noch saure Reaktion erhalten blieb. Nach kurzer Zeit erstarrte das Ganze in der Kälte zu einem aus Salzkristallen und Mutterlauge bestehenden Brei, den wir auf eine Goochfilterplatte brachten. Mit der Saugpumpe wurde dann eine das Opiumantigen enthaltende Mutterlauge abgenutscht, die in einen dichten Dialy-

sator mit großer Oberfläche gebracht wurde. Nach 24 stündiger Dialyse gegen fließendes kaltes Wasser wurde der Dialysatorinhalt mit einer geringen, gemessenen Menge $\frac{n}{10}$ Salzsäure versetzt, bei niederer Temperatur im Vakuum eingedunstet und zum Rückstand die äquivalente Menge $\frac{n}{10}$ Natronlauge gefügt. Das hierbei gebildete NaCl war für Injektionsversuche belanglos, da die Konzentration weit unter derjenigen einer physiologischen NaCl-Lösung lag.

Die biologischen Versuche mit dieser Toxinlösung ergaben vorzügliche Resultate, sobald es gelang, salzfreie Präparate herzustellen. Da diese indessen nur auf sehr umständliche Weise zu erzielen waren, außerdem die Gerbsäure gerade bei morphinhaltigen Lösungen nicht zu den idealen Alkaloidreagentien zählt, suchten wir nach einfacheren Methoden.

3. In einer dritten Versuchsreihe wurde die Frage geprüft, ob es möglich sei, bei Herstellung der Toxinlösungen das als Alkaloidfällungsmittel hoch geschätzte Jodjodkalium zu verwenden. Die umfangreichen Arbeiten unserer Alkaloidchemiker, namentlich Kippenbergers[1]) zeigten, daß wir Jodjodkalium zu denjenigen Alkaloidreagentien zählen dürfen, welche die vollständigste Entfernung der Alkaloide gewährleisten. So liegen Versuche vor, daß z. B. Kodein, Papaverin und Thebain, jene im Opium in relativ geringer Menge vorhandenen Alkaloide durch Jodjodkalium noch in Verdünnungen von 1 : 40000 bis 50000 erkannt werden, während mit Hilfe von Gerbsäure das Kodein nur mehr in Verdünnungen von 1 : 1000, Papaverin in solchen von 1 : 5000 und Thebain von 1 : 10000 nachgewiesen werden kann. Doch schien es fraglich, ob freies Jod nicht irgend welchen nachteiligen Einfluß auf die Opiumantigene ausüben würde. Dieses Bedenken war, wie sich später herausstellte, unbegründet. Wir schlugen folgenden Arbeitsgang ein:

10 g des möglichst frischen Opiums[2]) werden bei Zimmertemperatur mit 40 bis 50 ccm Wasser digeriert. Zum filtrierten,

---

[1]) Kippenberger, Nachweis von Giftstoffen. Berlin, Julius Springer 1897.

[2]) Sehr gut eignet sich das vielfach zum Rauchen verwendete, eine schmierige Masse darstellende „soft sleeping"-Opium, von dem wir eine größere Menge der Liebenswürdigkeit der Firma Gehe & Cie. in Dresden verdanken.

durch Nachspülen des Filters mit Wasser wenig vermehrten Auszug setzt man unter beständigem Umrühren tropfenweise einen Überschuß einer Lösung aus 10 g Jod + 20 g KJ + 250 ccm H_2O. Die Alkaloide werden hierdurch sofort als schokoladebraune, jodwasserstoffsaure Alkaloidsuperjodidverbindungen ausgeschieden. Nach einigem Stehenlassen filtriert man durch Asbest vom Niederschlag ab und prüft das Filtrat nochmals auf seine Indifferenz gegen weiter zugesetztes Alkaloidreagens. Ist keine Fällung mehr eingetreten, so handelt es sich weiter darum, aus dem Filtrate, das Opiumantigen enthält, sämtliches freies Jod zu entfernen. Dies gelingt leicht im Schütteltrichter durch etwa $^1/_4$ stündiges anhaltendes Schütteln mit metallischem Quecksilber. Es resultiert schließlich eine durch Opiumfarbstoff gelb gefärbte, nach Filtrieren völlig klare Lösung, die nur mehr an Kalium gebundenes Jod[1]) sowie Mekonsäure enthält und sofort in den Dialysator gebracht wird.

Der Inhalt des Dialysators ist nach beendigter Dialyse, die, wie oben beschrieben durchgeführt wird, auf völlige Freiheit von Kaliumjodid zu prüfen, alsdann nach der in Versuchsreihe 2 angegebenen Methode durch Eindampfen im Vakuum zu konzentrieren.

Das so gewonnene Opiumtoxin ist, wenn die Darstellung ohne Störung vor sich gegangen, vollkommen rein[2]).

Tiere, denen per os nicht allzu geringe Mengen des Präparates beigebracht worden sind, zeigen den andern Orts beschriebenen[3]) ersten ev. auch den zweiten Grad von Ermüdung. Die

---

[1]) Selbstverständlich ist in dieser Lösung nach dem Schütteln mit Quecksilber eine der Menge des vorhandenen Jodkaliums äquivalente Menge HgJ_2 als Quecksilberjodidjodkalium wieder in Lösung gegangen, das jedoch durch die nachfolgende Dialyse wieder entfernt wird.

[2]) Wenn es uns auch vorerst nicht gelungen ist, das Eiweißabspaltungsantigen nach einer dieser Methoden als solches in Substanz zu fassen, sondern nur hochwirksame Lösungen desselben herzustellen, so läßt sich immerhin aus dem Verhalten dieses interessanten Stoffes zu den in Anwendung gebrachten Reagentien bas. Bleiazetat, Gerbsäure, Jodjodkalium, insbesondere Quecksilberjodidjodkalium der berechtigte Schluß ziehen, daß hier ein seinem Ausgangsprodukt, dem Eiweißmolekül, chemisch schon recht ferne stehender Körper vorliegt.

[3]) Serolog. Studien aus dem Gebiete der exp. Therap. Ferdinand Enke, Stuttgart 1906.

mit dem spezifischen Antitoxin (sowohl mit dem im Tierkörper durch Injektion des Ermüdungstoxins erzeugten, als auch mit dem in vitro aus Eiweiß abgespaltenen) immunisierten Versuchstiere bleiben dagegen vollkommen munter. Ebensowenig werden derart immunisierte Tiere erheblich affiziert, wenn sie mit Lösungen des Opiumreintoxins subkutan oder intraperitoneal injiziert werden. Die nicht vorbehandelten Versuchstiere dagegen weisen nach der Injektion, entsprechend der Quantität des injizierten Ermüdungstoxins, alle Phasen der Ermüdung auf bis zum Sopor mit erheblicher Körpertemperaturerniedrigung und Atemverlangsamung. Nach genügender Latenzzeit tritt endlich unter Aufhören der Atmung der Tod ein. Wird dann schnell der Thorax geöffnet, so findet man das Herz noch in Tätigkeit; die Wirkung des Toxins erstreckt sich also vor allem auf das Atemzentrum. Krämpfe und ähnliche Störungen dürfen bei diesen Versuchen nicht beobachtet werden, sonst liegt Verdacht vor, daß das Präparat unrein ist.

Nur das reine Ermüdungstoxin wird durch ganz geringe Mengen des vorher gefütterten spezifischen Antitoxins vollkommen abgesättigt (entgiftet).

Enthält das Präparat noch Alkaloide oder verunreinigende Salze, so werden auch die Antitoxinmäuse affiziert. Allerdings sind die Latenzzeiten der Verunreinigungen sehr oft andere als die Latenzzeit, nach der unser Ermüdungstoxin in Wirkung tritt.

Genau so wie aus dem Opium haben wir übrigens das Ermüdungstoxin auch aus grünen Mohnköpfen herstellen können, die uns ebenfalls von der Firma Gehe und Co. in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt worden waren.

Nach dem oben Dargelegten dürfte die Vermutung nicht von der Hand zu weisen sein, daß ein Teil der spezifischen Wirkungen des Opiums auf die Anwesenheit der von uns nachgewiesenen Eiweißabspaltungsantigene zurückzuführen ist.

Sollte es gelingen, diese Stoffe in genügender Konzentration und wohlfeil für den praktischen Gebrauch herzustellen, so hätten wir in ihnen Mittel von hohem Wert; denn diese Substanzen vermögen in ihrer Eigenschaft als Antigene die Tiere aktiv zu immunisieren, und zwar in dem Sinne, daß ihre Leistungsfähigkeit gesteigert wird.

Es ist ferner nicht unwahrscheinlich, daß Eiweißabspaltungsantigen von Ermüdungstoxincharakter noch in anderen, nament-

lich dem Opium in ihrer Wirkung ähnelnden Drogen z. B. im Lactucarium, im Haschisch u. s. f. wird nachgewiesen werden können.

Schlußsätze:

1. Eiweißabspaltungsantigen von Ermüdungstoxincharakter ist sowohl durch seine biologischen Wirkungen als auch durch einen spezifischen Antikörper streng gekennzeichnet.

2. Eiweißabspaltungsantigen von Ermüdungstoxincharakter findet sich nicht nur im Tier-, sondern auch im Pflanzenreiche; es ist z. B. ein Bestandteil des Opiums.

3. Aus letzterem kann es nach vorheriger Entfernung der Alkaloide und mittels der Dialyse rein gewonnen werden.

4. Ein Teil der komplexen Wirkung des Opiums dürfte auf die Anwesenheit dieses Antigens zurückzuführen sein.

Literatur.

1. Winterstein, H., Über Ermüdung. Med. Klinik **1906**, Nr. 48.

2. W. Weichardt, Training im Lichte der modernen Immunitätslehre. Festschr. f. Rosenthal, Georg Thieme Leipzig **1906**.

3. Zuntz, Loewy, Müller, Caspari, Höhenklima und Bergwanderungen. Bong & Co. **1906**.

4. Weichardt, Jahresber. über die Ergebnisse der Immunitätsforschung 1906. Ferdinand Enke, Stuttgart **1906**.

5. L. Heim, Lehrbuch der Bakteriologie. Ferdinand Enke, Stuttgart **1906**.

Über Störungen des Eiweißabbaues durch Blausäure.

I. Mitteilung.

Von

A. Loewy-Berlin.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 31. Januar 1907.)

Je tiefer wir in die Kenntnis der Vorgänge eindringen, auf denen der Stoffumsatz im tierischen Organismus beruht, um so mehr müssen wir zu der Anschauung gelangen, daß er durch ein zweckmäßiges Ineinandergreifen einer großen Zahl von fermentativen Prozessen zustande kommt. Dieser schon seit langem geäußerte Gedanke ist besonders eingehend von Hofmeister[1]) verfolgt worden, und seine Richtigkeit wurde seitdem durch neue Funde befestigt, aus denen besonders klar hervorging, daß spezifische Fermente es sind, die auf den verschiedenen Abbaustufen eingreifen und zur Weiterzerlegung der bis dahin gebildeten Produkte führen. Insbesondere gilt dies für die Eiweißstoffe. aber auch für die Kohlehydrate liegen analoge Erfahrungen vor.

Man darf deshalb heute wohl eine Reihe von Stoffwechselerkrankungen, bei denen Substanzen aus dem Körper austreten, die unter normalen Verhältnissen im Körper hätten verbrannt werden müssen, auf den Fortfall von Fermentwirkungen bezw. auf die Unwirksamkeit der im einzelnen Falle in Betracht kommenden spezifischen Fermente zurückführen. Abgesehen von dem

---

[1]) F. Hofmeister, Die chemische Organisation der Zelle. Braunschweig 1901.

den Zuckerumsatz betreffenden Diabetes mellitus und all' den verschiedenen Formen von pathologischer Glykosurie seien hier nur die Pentosurie sowie zwei auf mangelhaftem Eiweißzerfall beruhende Erkrankungen erwähnt: die Alkaptonurie und die Cystinurie, bei denen eine solche Auffassung nach dem Stande unserer heutigen Kenntnis geboten erscheint. — Am wenigsten tatsächlich begründet ist sie vorläufig noch für den Fettzerfall, aber es liegt nahe und der experimentelle Beweis ist vielleicht nicht unmöglich, daß manche Fälle von Ausscheidung fetter Säuren oder von „Acetonkörpern" gleichfalls dem Ausfall spezifischer fermentativer Prozesse ihr Entstehen verdanken.

Experimentell läßt sich bisher nur ein Teil der natürlich vorkommenden Störungen des Stoffwechsels erzeugen; man hat sich dabei zweierlei Wege bedient, um zum Ziel zu gelangen, die jedoch beide nicht denen, die man für das pathologische Zustandekommen der gleichen Störungen annehmen muß, entsprechen. Da der Stoffwechsel im tierischen Organismus im wesentlichen ein oxydativer ist, so versuchte man zunächst durch Beschränkung der Sauerstoffzufuhr auf ihn einzuwirken. Es gelingt so, den Abbau der Hexosen und des Eiweißes zu verändern, vielleicht auch den der Fette, da z. B. bei der durch Sauerstoffmangel wirkenden Kohlenoxydvergiftung die Verbrennung von per os zugeführten Acetonkörpern, die man wohl auf Grund der neueren Untersuchungen mit dem Fettzerfall in Beziehung bringen darf, mehr oder weniger erheblich beeinträchtigt ist[1]).

Der zweite zu Störungen des normalen Stoffabbaues führende Weg ist in der Zuführung gewisser Gifte gegeben.

Am leichtesten gelingt es auf diese Weise — und eine große Anzahl ganz differenter Stoffe erweist sich hier als wirksam — den Kohlehydratstoffwechsel zu schädigen. Der Eiweißumsatz dagegen konnte bisher nur durch wenige Gifte in so umfänglichem Maße verändert werden, daß quantitative und qualitative Abweichungen von der Norm chemisch bestimmt nachweisbar waren. Dabei handelte es sich stets um schwere, schon morphologisch hervortretende Schädigungen des Zellprotoplasmas. — Als Typus der auf den Eiweißzerfall wirkenden Gift kann der Phosphor dienen.

---

[1]) Araki, Ztschr. f. physiol. Chem. **15—17**.

Die Wirkungsweise der in Betracht kommenden Gifte ist eine verschiedene. Die Mehrzahl der zu Störungen des Kohlehydratabbaues führenden wirkt — wenigstens nach der heute wahrscheinlichsten Anschauung — dadurch, daß sie ihrerseits zunächst Sauerstoffmangel der Gewebe erzeugt, und dieser stellt dann das eigentlich wirksame Moment da. Demgegenüber führen die zu pathologischem Eiweißabbau führenden Protoplasmagifte primäre Schädigungen der Zellen herbei, die dadurch zur Leistung ihrer oxydativen Tätigkeit unfähig werden.

Daneben gibt es Stoffe, die in der Weise wirksam sind, daß sie intermediäre Zerfallprodukte, sei es der Kohlehydrate, sei es des Eiweißes, abfangen, sich mit ihnen verbinden und sie so vor weiterer Zersetzung schützen, während die Verbindung als solche zur Ausscheidung kommt.

Bezüglich der Art der experimentell erzeugbaren Störungen ist nun bemerkenswert, daß es bisher nicht gelang, diejenigen hervorzurufen, die sich durch ihren chronischen Bestand, ihre mangelnde Neigung zum Fortschreiten und zur Erzeugung weiterer Störungen, durch ihr frühzeitiges Auftreten — oft schon mit der Geburt —, zum Teil auch durch ihre Vererbbarkeit auszeichnen. Es handelt sich um Störungen, die man in Analogie einer Bezeichnung der älteren Medizin als chemisches *πάϑος* der *νόσος*, wie sie der Diabetes darstellt, gegenüberstellen könnte. Alkaptonurie, Cystinurie und Pentosurie wie auch die reinen Formen der Fructosurie sind hierfür die typischen Beispiele. Was bisher experimentell erreicht werden konnte, war nur eine Verhinderung des Abbaues überhaupt, so bei der Glykose, oder eine Unterbrechung desselben auf einem intermediären Stadium, wobei alle oder doch eine große Zahl der auf der Abbaustufe gebildeten Produkte zur Ausscheidung kamen, wie wir es bei den Eiweißkörpern sehen.

Bisher nicht untersucht und dabei insbesondere für den Eiweißabbau von Interesse ist die Frage, was sich ergibt, wenn man in engerer Anlehnung an die natürlichen Bedingungen den Stoffzerfall durch Einflüsse zu stören sucht, die ohne nachweisbare anatomische Veränderungen zu machen, die oxydativen Fähigkeiten der Gewebe vorübergehend aufheben. Wir sind seit längerem mit einem Gift bekannt, das in diesem Sinne wirkt und das sich deshalb für derartige Untersuchungen besonders eignet, das

ist die Blausäure. Besonders Geppert[1]) verdanken wir den exakten Nachweis vom Wesen ihrer Wirkung. Er konnte zeigen, daß sie darauf beruht, daß die Körperzellen unfähig werden, Sauerstoff aufzunehmen und Kohlensäure zu bilden.

Geppert fand dies Verhalten durch Untersuchung der Blutgase und der Respiration bei Ruhe und bei Muskelarbeit. — Unbekannt ist, wie sich dabei der Eiweißabbau verhält; daß er Abweichungen von der Norm zeigen würde, war vorauszusehen.

Ich habe nun vier Stoffwechselversuche an Hunden mit Rücksicht auf die Änderungen des Eiweißabbaues bei Blausäurevergiftung durchgeführt.

Als Versuchstiere dienten Hündinnen, die sich gut katheterisieren ließen und die ihren Harn nicht spontan entleerten. Sie hielten ihn stets in der normalen Vorperiode, die der Vergiftungsperiode vorausging. In letzterer kam es allerdings, wenn die Vergiftung schwer war, manchmal infolge der Blasenlähmung zu Entleerungen in den Käfig. Diese Harnmengen liefen in ein untergestelltes, zur Verhütung von Zersetzungen des Harns mit etwas Salzsäure beschicktes Gefäß ab und wurden mit dem Spülwasser vereinigt, mit dem an den betreffenden Tagen der Boden des Käfigs gesäubert wurde.

Diese Harnportionen wurden teils für sich verarbeitet, teils mit dem durch Katheter entleerten Harn zusammengetan.

An einigen Hunden wurde zunächst die für meine Zwecke notwendige Menge Cyankali mit für die einzelnen Versuchsreihen stets frisch bereiteten Cyankalilösungen festgestellt. Sie sollte so bemessen sein, daß es zu Krämpfen mit folgenden Lähmungen kam, die nach einigen Stunden wieder schwanden. Die Einverleibung des Giftes sollte dann wiederholt werden, so daß auf den Tag 3 bis 4 Vergiftungen kamen.

Die Dosis, die sich als zweckmäßig erwies, lag etwas über der von Geppert in seinen Untersuchungen benutzten, nämlich zwischen 1 und 1,5 mg Blausäure pro Kilo Tier. — Ich verwandte eine $^1/_2$ $^0/_0$ige frische Cyankalilösung. 2 $^1/_2$ mg Cyankali entsprechen 1 mg Blausäure.

---

[1]) J. Geppert, Über das Wesen der Blausäurevergiftung. Berlin 1889. Auch Ztschr. f. klin. Medizin **15**.

Am 20. Dezember 1905 begann der erste Versuch mit dem Katheterismus des Hundes, der täglich zur selben Zeit wiederholt wurde. Das Tier erhielt von nun ab täglich 250 g Hackfleisch mit einem Stickstoffgehalt von gegen 7 g, das für die ganze Versuchsreihe besorgt, in 10 Gläser von vornherein abgeteilt und sterilisiert wurde. Dazu 30 g Fett pro die. — Am vierten, fünften und sechsten Versuchstage wurde frühmorgens um 8 Uhr, nachmittags um 2 Uhr und abends um 7 Uhr die Cyankalilösung injiziert in einer Dosis, die am ersten Tage je 7,5 mg Blausäure, das ist 1 mg per Körperkilo, entsprach, an den folgenden Tagen etwas höher war. Sobald das Tier sich nach der ersten Injektion erholt hatte, zwischen 11 und 12 Uhr mittags, erhielt es sein Futter vorgesetzt, das es sogleich vollkommen verzehrte. Nur ein einziges Mal trat nach der um 2 Uhr stattfindenden zweiten Injektion Erbrechen des Futters ein, jedoch wurde das Erbrochene nach Ablauf der Vergiftungserscheinungen wieder quantitativ aufgefressen. Sonst wurde der Versuch durch keine Zwischenfälle gestört. Waren die Folgen der Injektion abgelaufen, so war das Tier vollkommen munter und ließ keine Krankheitserscheinungen erkennen. Es wurde nach Abschluß der Versuchsreihe für andere Zwecke verwandt.

Der Harn wurde auf Zucker, Eiweiß, Albumosen geprüft, wobei der per Katheter entleerte und der in den Käfig gelassene Anteil gesondert untersucht wurde. In jeder Harnportion wurde der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt, ferner die Menge der Aminosubstanz in Form ihrer Naphtylcyanatverbindungen nach Neuberg und Manasse[1]), endlich in dem mittels Katheter entleerten Harn der Brennwert in der kalorimetrischen Bombe.

Die Ergebnisse enthält die folgende Tabelle (vgl. Tab. I). Aus ihr geht hervor, daß der Hund, der sich annähernd auf seinem Körpergewicht hielt, während der Vorperiode eine in engen Grenzen schwankende Stickstoffausscheidung zeigt; vom zweiten Versuchstage abgesehen, besteht die Tendenz zu einer Stickstoffretention. Auch die Menge der aus dem Harn darstellbaren Naphtylverbindungen ist an den letzten beiden Vortagen nicht sehr different.

Der kalorische Quotient des Harns liegt innerhalb der von Rubner für den normalen Hund ermittelten Grenzen.

Die Tage der Cyankaliinjektionen bringen nun erhebliche Veränderungen.

---

[1]) C. Neuberg u. A. Manasse, Ber. d. dtsch. chem. Ges. 38, 2359. 1905.

Versuchsreihe I. Mit gleichmässiger Fütterung.

Datum 1905	Körper-gewicht in g	Harnstick-stoff für 24 Std. in g	Naphtylver-bindungen im Harn in 24 Std. in g	1 ccm des durch Katheter entleerten Harns enthält: N mg	Kalorien	Kal./N	Bemerkungen
21. Dez.	7470	6,599	—	—	—	—	Vorperiode.
22. „	7570	7,380	—	12,045	74,43	6,43	
23. „	?	7,020	0,514	12,12	91,82	7,56	
24. „	7640	6,633	0,440	29,88	213,50	7,14	
25. „	7610	10,596	0,960	7,65	87,61	11,5	Hauptperiode*) täglich dreimalige Einspritzung von Cyankalilösung.
26. „	7500	8,975	1,005	29,5	268,60	9,1	
27. „	7530	5,969	—	23,04	187,14	8,99	
28. „	?	9,070	0,879	37,71	307,10	8,14	Nachperiode.
29. „	7600	7,384	—	44,42	331,60	7,4	
30. „	?	Verloren.					

*) Nach der ersten Injektion allgemeine Krämpfe, die ca. 1 Stunde dauern, darnach längere Taumlichkeit. Nach der zweiten Injektion Erbrechen des nach der ersten Injektion genossenen Futters, das später wieder vollständig verzehrt wird. — Am 26. früh nach erneuter Injektion für ca. 2 Stunden Taumlichkeit und Krämpfe; dasselbe nach den beiden folgenden Injektionen. — Etwas Harn in den Käfig gelassen. — Am 27. nach den zwei ersten Injektionen nur Taumeln und Steifigkeit der Extremitäten. Keine allgemeinen Krämpfe. Nach der dritten größeren Injektion schwere allgemeine Krämpfe, denen stundenlange Lähmungen folgen, in denen das Tier regungslos und nur schwach und unregelmäßig atmend auf der Seite liegt. — Harn vom 25. auffallend blaß, der am 26. und 27. dunkler.

Am 25. Injektionen von 7 mg Blausäure, am 26. von 8 mg, am 27. von 9 bis 11 mg Blausäure.

Im Harn nie Eiweiß, nie Biuretreaktion. An den Injektionstagen starke Reaktion mit Millons Reagens.

Zunächst steigt die Gesamtstickstoffausscheidung durch den Harn von **6,633** g am letzten Vortage auf **10,596** g an, d. h. um **3,963** g, annähernd um 60%. Gegenüber dem Mittelwert der Stickstoffausscheidung pro die in der Vorperiode beträgt die Zunahme **3,688** g, d. s. + **53**%. Auch am zweiten Tage mit Cyankaliinjektion liegt der Harnstickstoffwert noch über den Werten der Vorperiode. Allerdings weniger als am ersten Tage; das Plus beträgt gegenüber dem letzten Vortage immerhin noch: **2,342** g = 35%. Am dritten Vergiftungstage allerdings war keine Steigerung zu erkennen, vielmehr lag der Stickstoffwert unter denen

der Vorperiode. Ziehen wir den sehr hohen Wert des ersten Nachtrages in Betracht, so drängt sich die Vermutung auf, daß die Blasenentleerung am dritten Haupttage (27. Dez.) eine nicht vollkommene gewesen sein mag, so daß ein Teil des dem 28. Dezember zugeteilten Harns und Harnstickstoffs dem 27. Dezember zukäme. Das Mittel beider Tage ist 7,52 g N, also eine Zahl, die über denen der Vorperiode liegt.

Am zweiten Nachtage ist die Stickstoffausscheidung zur oberen Grenze der Werte der Vorperiode zurückgekehrt.

Mitteln wir die Stickstoffwerte der drei Perioden, so erhalten wir für die tägliche Stickstoffausscheidung im Mittel der Periode I: **6,908** g, der Periode II: **8,513** g, der Periode III: **8,227** g.

Neben der Stickstoffausscheidung im Harn zeigt sich nun auch der kalorische Quotient durch die Vergiftung erheblich beeinflußt.

Er ist gegenüber der Vorperiode, in der er zwischen **6,43** und **7,56** liegt, und im Mittel **7,04** ausmacht, an allen drei Vergiftungstagen erhöht. Am intensivsten am ersten Tage zu dem enormen Wert von **11,5**, weniger am zweiten **9,1**; aber auch am dritten Tage beträgt er noch fast **9,0**, ein Zeichen dafür, daß der niedrige Wert für die Stickstoffausscheidung (5,97 g pro die) keinen Beweis für einen normalen Ablauf des Eiweißumsatzes abgibt. Der Wert ist, wie oben angedeutet, vielleicht zweifelhaft. Aber die Ergebnisse der folgenden Versuchsreihen werden zeigen, daß selbst erhebliche Steigerungen des kalorischen Quotienten eintreten können, ohne daß die Stickstoffausscheidung erhöht zu sein braucht.

Zeigt das Verhalten des kalorischen Quotienten ganz allgemein, daß während der Cyankalivergiftung Stoffe in den Harn übergegangen waren, die einen höheren Brennwert als normal haben, so gibt uns die Untersuchung nach der Neuberg-Manasseschen Naphtylisocyanatmethode den Beweis dafür, daß Produkte des Eiweißzerfalls zu diesen Substanzen gehören, also an der Erhöhung des kalorischen Quotienten beteiligt sind. Nach den Untersuchungen von Neuberg und Manasse handelt es sich um die Amidgruppe enthaltende Abkömmlinge des Eiweißes, mit denen das Naphtylcyanat Verbindungen eingeht.

Die Menge der Naphtylverbindungen beträgt im Mittel pro Tag **0,477** g in der Vorperiode, sie erhebt sich auf im Mittel

0,982 g in der Vergiftungsperiode. Der Zuwachs beträgt **0,505** g d. s. **106**%.

Bei der Art des Eiweißabbaues, die im wesentlichen über die Amidsubstanzen erfolgt, dürfte das Naphtylcyanatverfahren zum mindesten die Hauptmenge der pathologischen stickstoffhaltigen Substanzen, die in den Harn übergingen, angeben.

Albumosen oder Eiweiß enthielt der Harn nicht, ebensowenig Acetonkörper, auch kein Cystin. Was die etwaige Gegenwart von Zucker oder Glykuronsäure anbelangt, so ist diese für den 26. und 27. Dezember auszuschließen, wo der Harn keine Reduktion zeigte. Am 25. Dezember war eine ganz geringe Reduktion zu erkennen, jedoch war polarimetrisch Zucker nicht sicher nachweisbar.

An der Steigerung des kalorischen Quotienten sind danach intermediäre Eiweißzerfallprodukte ursächlich beteiligt. Ob ihre Gegenwart im Harn die einzige Ursache der Änderung des kalorischen Quotienten ist, muß als noch unentschieden betrachtet werden.

Die folgenden Versuchsreihen II und III sind im wesentlichen ebenso angelegt wie Reihe I, nur hungerten die Tiere vom Beginn des Versuches ab, um nicht durch Erbrechen das Ergebnis zu gefährden. Hungerhunde erbrechen, wenn überhaupt, nur ganz geringe Mengen schleimiger Flüssigkeit. Auch wurden die Blausäuredosen höher gewählt, sodaß die Tiere sich von den letzten Injektionen nicht mehr erholten. Im Versuch II (auch in IV) gingen die Tiere im Coma zugrunde, im Versuch III war das Tier so schwer und dauernd krank, daß es durch Chloroforminjektion ins Herz getötet wurde.

Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe sind im großen ganzen denen der ersten gleich. Eine Steigerung der Stickstoffausscheidung bis zu einem Maximum von 62% (am 22. Juni) gegenüber dem letzten Vortage (30. Mai), ein erhebliches Ansteigen des kalorischen Harnquotienten von **7,75** im Mittel der Vortage auf **10,13** am ersten und auf **10,73** am zweiten Vergiftungstage. Dabei gibt der Harn nach der Vergiftung Millonsche und Biuretreaktion, die vorher nicht positiv waren.

Die Stickstoffausscheidung zeigt insofern einen gewissen Gegensatz zu der im Versuch I, als sie am ersten Vergiftungstage sich noch auf der gleichen Höhe wie am Vortage erhält, erst am zweiten Tage und mehr noch am dritten ansteigt.

Versuchsreihe II. Hungerversuch.

Datum 1906	Körpergewicht in g	Harnstickstoff in 24 Std. in g	1 ccm des Harns enthält N mg	1 ccm des Harns enthält Kalorien	$\frac{\text{Kal.}}{\text{N}}$	Bemerkungen
28. Mai	9220	3,157	—	—	—	**Vorperiode.** Harn normal; nichts spontan entleert bis zum 31. Mai.
29. „	8650	2,832	14,16	114,4	8,08	
30. „	8440	2,424	12,28	91,12	7,42	
31. „	8220	2,436	a. 7,98 b. 0,9	80,88 8,6	10,13 9,55	**Haupt- und Nachperiode*).** Hund erhält am 31. 5. um ½11 Uhr = 1,6 mg Blausäure pro Kilo = 14 mg; keine Erscheinungen bis 2 Uhr. Um 3 Uhr 18 mg, um 8 Uhr nochmals 18 mg. Harn gibt am 1. 6 abends und 2. 6. starke Reaktion mit Millon. Biurotreaktion am 31. 5. abends stark, schwach am 1. 6. abends, undeutlich am 2. 6. — Nie Reduktion. — Eiweißreaktion undeutlich. Harn vom 31. Mai a) in den Käfig entleert; b) durch Katheter gewonnen.
1. Juni	—	3,1286	21,04	22,78	10,73	
2. „	—	3,936	24,60	24,05	9,8	

*) Nach der zweiten Injektion schwache Krämpfe und Lähmungen; nach der dritten wenig Krämpfe, doch langdauernde Lähmungen bis zum 1. 6. früh. Dann gehen sie in an Lähmung grenzende Paresen über, die bis zum Tode am 3. 6. abends anhalten. — Am 1. 6. früh: Zunge ist weit herausgestreckt, hellrot, Konjunktiven und Schnauze gleichfalls hellrot, Pupillen eng, Reaktion auf Licht unsicher. Atmung tief und schnarchend. Coma. — Die Atmung wird im Laufe des Tages flach und sehr selten, dann Cheyne-Stokessche Atmungsform. — Hund liegt meist auf Seite, zuweilen setzt er sich auf und hält dann stets den Kopf zwischen den Vorderbeinen, die Schnauze berührt die Erde. — Der mit Katheter entleerte Harn ist sehr hell (vgl. Hund I). Neben dem Katheter läuft infolge Schließmuskellähmung etwas Harn ab. Der größte Teil des Harns in Kasten entleert.

2. Juni: Zustand annähernd derselbe: die dauernd herausgestreckte Zunge, Konjunktiven, Analschleimhaut, Vaginalschleimhaut hellrot. Hund liegt meist mit gesenktem Kopf auf dem Bauch. Comatös. — Harn in Kasten entleert, beim Katheterisieren kommen nur einige Tropfen neben dem Katheter heraus. — 3. Juni: Zustand derselbe, Blase leer, Harn nachts in Kasten entleert. — Koma nimmt zu, Tod am 3. Juni abends.

Trotzdem ist der kalorische Quotient bereits am ersten Tage der Blausäureinjektionen erheblich gesteigert, weit über die Werte, die bei normalen Hunden bisher gefunden worden sind. Sein Verhalten ist also ein s i c h e r e r e r Maßstab für pathologische Änderungen im Stoffumsatz als quantitative Abweichungen von der normalen Stickstoffausscheidung.

In der dritten Versuchsreihe, über die Tabelle III Aufschluß gibt,

Versuchsreihe III. Hungerversuch.

Datum 1906	Körpergewicht in g	Harnstickstoff in 24 Std. in g	1 ccm Harn enthält N mg	1 ccm Harn enthält Kalorien	Kal./N	Bemerkungen
28. Juni	4200	2,145	6,60	37,00	5,60	Vorperiode.
29. "	—	1,860	7,54	55,60	7,47	
30. "	4010	1,8142	8,85	99,40	11,24	Hauptperiode*).
1. Juli	—	?	?	?	?	
2. "	—	—	9,72	11,50	11,84	
3. "	—	0,9696	5,00	51,40	10,28	

*) Hund erhält mittags 1,25 mg Blausäure per Körperkilo subkutan, galliges Erbrechen. Keine Harnentleerung; Taumlichkeit, Schwäche, die in eine dreiviertel Stunden dauernde Lähmung übergeht. Keine allgemeinen Krämpfe. Die zweite und dritte Injektion macht nur Taumlichkeit ohne sonstige deutliche Wirkung. Am 1. Juli gleiche Injektion früh macht nur Schwäche. Mittags 1,5 mg Blausäure pro Kilo Tier, zunächst nur Schwäche ohne Krämpfe, dann Coma. Hund macht tiefe schnelle Inspirationen 8 bis 10 mal pro Minute, passive Exspirationen, lange Atempausen. Liegt auf der Seite ohne Reaktion auf Berührung. Cornealreflexe vorhanden. Zustand hält bis zum Abend an.

Am 2. Juli ist kein Harn beim Katheterismus zu gewinnen. Hund noch schwer benommen und fast gelähmt. Liegt auf der Seite, hält sich, wenn aufgerichtet, nur wenige Sekunden aufrecht, sinkt dann wieder um. Am 3. Juli dasselbe Verhalten. Kein Urin durch Katheter zu gewinnen, Harn in den Käfig entleert. Nach erneuter Injektion von 1,3 mg Blausäure p. K., vollkommene Unbesinnlichkeit, tiefe Atmung mit starker aktiver Exspiration. Harn in den Käfig. Blase leer. — 4. Juli derselbe Zustand. Tötung durch Chloroforminjektion ins Herz. — Blase leer.

Der Harn enthält nie Eiweiß, reduziert nie, gibt nur am 3. 7. schwache Biuretreaktion. Millons Reaktion nur am 3. 7. positiv.

waren trotz gleicher Blausäuredosen wie im Versuch II die Vergiftungserscheinungen stärker als in diesem, wie die unter der Tabelle verzeichneten Bemerkungen ergeben. Deshalb gelang eine allseitig glatte Durchführung des Versuches nicht. Am zweiten Vergiftungstage, 1. Juli, stockte die Harnbereitung vollständig. In den Käfig wurde nichts entleert, und beim Katheterismus am 2. Juli fand sich die Blase leer.

Dann begann die Harnsekretion wieder. Die geringen Mengen Harn gingen in den Käfig. Beim Katheterismus am 3. Juli erwies sich die Blase wieder leer, ebenso am 4. Juli.

Die Schädigung der Nierenfunktion durch die Blausäure und die dadurch bewirkte Stockung oder ganz beträchtliche Verminde-

rung der Harnabscheidung läßt eine Steigerung der Stickstoffausscheidung hier nicht zur Beobachtung kommen. Die Harnstickstoffmenge des ersten Blausäuretages ist gleich der des letzten Vortages, die des dritten Vergiftungstages, an dem allerdings nur wenige ccm entleert wurden, ist sogar etwa auf die Hälfte gesunken.

Dagegen erweist sich der kalorische Harnquotient wieder in typischer Weise verändert. Er geht hier noch höher hinaus als in den vorhergehenden Versuchen, besonders als im Versuch II, was ungezwungen mit den stärkeren Vergiftungserscheinungen in Zusammenhang gebracht werden kann.

Die vierte Versuchsreihe endlich — vergl. Tab. IV —

Versuchsreihe IV. Fütterungsversuch.

Datum 1906	Körpergewicht in g	Harnstickstoff in 24 Std. in g	1 ccm Harn enthält N mg	1 ccm Harn enthält Kalorieen	Kal./N	Bemerkungen
3. Juli	8800	1,032	—	—	—	Vorperiode: aller Harn durch Katheter entleert.
4. „	—	1,512	8,64	54,5	8,62	
5. „	8650	1,7451	4,59	33,9	7,38	
6. „	8480	2,079	6,30	53,7	8,53	
						Hauptperiode*):
7. „	8400	2,6652	3,29	a. 32,6	9,96	a) Bald nach Eintritt der Vergiftung;
			3,54	b. 73,0	20,63	b) 24 Stunden nach Vergiftung, kurz ante mortem.
8. „	8320	—	—	—	—	

*) Hund erhält am 7. Juli früh 1,25 mg Blausäure pro Körperkilo, mittags nochmals 1 mg. Nach der ersten Einspritzung keine wahrnehmbaren Symptome, außer einmaligem schleimigem Erbrechen. Nach der zweiten Injektion Schwäche. Am 8. Juli früh wieder 1,25 mg Blausäure subkutan, darnach einmaliges Schleimbrechen, Taumlichkeit bis zum Mittag. Dann setzen allgemeine Krämpfe ein, die mit Lähungen abwechseln. Tod gegen Abend.

In der Vorperiode wurde kein Harn spontan entleert. In der Nacht zum zweiten Injektionstage (8. Juli) trüber, bräunlicher Harn in den Kasten entleert. Am 8. Juli Harn durch Katheter mittags einige Stunden ante mortem entleert. Der in den Kasten entleerte Harn enthält: 2,3364 g N, der durch Katheter entleerte: 0,3288 g N. Beide Portionen zusammen bilden die Harnmenge von 24 Stunden.

Der Harn enthält nie Eiweiß. Am 4. 7. und 6. 7. mäßig starke Biuretreaktion, am 5. 7. schwache. Kastenharn vom 7. 7. ebenso schwache, Katheterharn, am 8. 7. entleert, sehr starke Biuretreaktion. Nie Reduktion, Millon-Reaktion undeutlich.

sollte wieder ein Versuch mit gleichmäßiger Fütterung werden. Er gelang nur in der Vorperiode. Am ersten Vergiftungstage verweigerte der Hund das Futter, am zweiten abends starb er.

Es konnte jedoch der gesamte Harn des ersten Vergiftungstages erhalten werden, ein Teil war in den Kasten entleert worden — Probe a vom 7. Juli —, ein Teil wurde durch Katheter gewonnen — Probe b.

Hier sehen wir nun, daß ebenso wie im Fütterungsversuch I ein Mehrzerfall an stickstoffhaltiger Substanz nach der Vergiftung einsetzt. Das vor dem Versuch schlecht genährte Tier zeigt während der Vorperiode bei eiweißreicher Fütterung zwar auch schon einen Anstieg der Stickstoffausscheidung, aber der erste Vergiftungstag war ein Hungertag und hier wäre ein Weiteranstieg unter normalen Verhältnissen unterblieben.

Bei der Vergiftung finden wir dagegen ein unverhältnismäßig starkes Weiteransteigen, das auf Rechnung der Vergiftung gesetzt werden muß.

Daneben finden wir wiederum ein ausgeprägtes Ansteigen des kalorischen Quotienten bereits in dem einige Stunden nach der Vergiftung entleerten Harn und sehen, daß er sich einige Stunden ante mortem zu einer Höhe erhebt — $\frac{\text{Kal.}}{\text{N}} = \mathbf{20{,}63}$ — wie er, von Wiederkäuern abgesehen, bisher überhaupt nicht beobachtet worden ist.

Überblicken wir die Ergebnisse der vorstehenden Versuchsreihen, so finden wir, daß bei einer Hemmung der oxydativen Leistungen der Körperzellen Störungen im Stickstoffwechsel auftreten, die sich in charakteristischen Veränderungen des Harns zu erkennen geben.

Die typischste und zuverlässigste besteht in einer Verschiebung des Verhältnisses von Brennwert zu Harnstickstoff. Der Quotient $\frac{\text{Kal.}}{\text{N}}$ steigt über die normalen Werte hinaus an; in einem Falle (Vers. IV) bis zum dreifachen dieser.

An dieser Änderung des kalorischen Quotienten beteiligt ist das Auftreten intermediärer Eiweißspaltprodukte, die in Versuch I in Form ihrer Naphtylcyanatverbindungen isoliert wurden. Reduzierende Stoffe wurden in keinem Falle im Harn gefunden, wohl aber mehrfach stärkere Biuret- und Millonsche Reaktion.

Die Quantität des Harnstickstoffs war nicht in allen Fällen gesteigert. Eine pathologische Steigerung des Harnstickstoffes stellt jedenfalls einen viel weniger sicheren Maßstab für einen anormalen Verlauf des Eiweißumsatzes dar als Abweichungen des kalorischen Quotienten von der Norm.

Der Grad der Steigerung der Harnstickstoffmenge steht vielleicht in Beziehung zur Menge des zirkulierenden Eiweißes, denn die Steigerung war am ausgeprägtesten in demjenigen Versuche (No. I), in dem reichliche Nahrungszufuhr bis zum Schlusse gelang. Weniger deutlich fand sie sich im Versuch IV, wo das Versuchstier nur bis zum Beginn der Vergiftung sein Futter nahm. Dagegen war sie in den beiden Hungerversuchen (II und III) am ersten Vergiftungstage überhaupt nicht zu finden, um in Versuch II in den späteren einzusetzen. —

In ihren Untersuchungen über die Wirkung der verdünnten Luft auf den Organismus fanden Fränkel und Geppert[1]) einen ähnlichen Zusammenhang zwischen dem Ernährungszustande und der Steigerung der Stickstoffausscheidung, die infolge der Luftverdünnung zustande kam. Bei hungernden Hunden war letztere geringer als bei gefütterten, nur trat sie allerdings bei ersteren früher ein als bei letzteren, während sie bei meinem Hungerhund II später einsetzte als bei meinem gefütterten.

Es wird also unter der Wirkung der Blausäure mehr Eiweiß in den Zerfall gezogen, aber nicht alles in normaler Weise bis zu seinen Endprodukten zerlegt. Als Ursache dieses Effektes könnte man an die durch das Gift ausgelösten Krämpfe denken. Sie mögen den pathologischen Eiweißabbau begünstigen, sie genügen aber nicht, um ihn ganz zu erklären. Dazu sind sie (oder waren es wenigstens bei den von mir gewählten Dosen) zu kurzdauernd und zu wenig intensiv. Bei meinen Tieren beherrschten lähmungsartige Schwächezustände das Krankheitsbild, wie die einzelnen Versuchsprotokolle zeigen, und man muß die die Änderungen der Zellfunktionen, die zu diesen führten, auch für die Abweichungen im Eiweißabbau verantwortlich machen. —

Die Wirkung der Blausäure, durch die die Zellen die Fähigkeit verlieren, den an ihnen vorbeiströmenden Sauerstoff zum oxydativen Abbau der organischen Stoffe in normaler Weise zu verwerten, hat sich im wesentlichen derjenigen gleich erwiesen, die erreicht wird, wenn die Sauerstoffzufuhr zu den Zellen über das notwendige Maß hinaus beschränkt war.

---

[1]) A. Fränkel und J. Geppert. Wirkungen der verdünnten Luft auf den Organismus. Berlin, 1883.

Das zeigt ein Vergleich mit den Resultaten einer ganzen Reihe früherer Untersuchungen, in denen der Eiweißumsatz, sei es beim Aufenthalt in verdünnter Luft, sei es bei Atmung sauerstoffarmer Gasgemische, sei es bei Kohlenoxydvergiftung, ermittelt wurde[1]. Auch dabei wurde ein Mehrzerfall von Eiweiß und ein Auftreten intermediärer Eiweißspaltprodukte im Harn beobachtet.

Ob feinere Unterschiede vorliegen, läßt sich auf Grund des vorliegenden Untersuchungsmaterials nicht sicher sagen. Hinweisen möchte ich jedoch auf die eine, wie es scheint, konstante Tatsache, daß bei der Blausäurevergiftung die Steigerung des Eiweißzerfalles bei gefütterten Tieren schon am ersten Vergiftungstage eintritt, daß jedoch bei den in einen luftverdünnten Raum gebrachten Tieren durchgehend nicht an demselben, sondern erst am nächsten und übernächsten Tage die Stickstoffmenge im Harn zunahm. Ob dieser Differenz eine tiefere Bedeutung zukommt, müßte weiter untersucht werden.

---

[1]) A. Fränkel, Virchows Anh. **67**. — A. Fränkel und F. Geppert, a. a. O. — S. Lewy, Zeitschr. f. klin. Med. **4**. — Araki, Ztschr. f. physiol. Chem. **15** und **17**. — A. Loewy, Deutsch. medizin. Wochenschr. **1905**.

Über den respiratorischen Stoffwechsel nach ermüdender Arbeit.

Von

Dr. Otto Porges und **Dr. Ernst Pribram.**

(Aus dem tierphysiol. Institut der landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin.)

(Eingegangen am 28. Januar 1907.)

Die Beobachtung des Kraftstoffwechsels mit Hilfe der Zuntzschen Methode hat zu der Erkenntnis geführt, daß der Umsatz bei vollständig ruhender Muskulatur ein konstanter Wert ist, der nur in wenigen Fällen eine Steigerung oder eine Verminderung erfährt. So z. B. hat es sich im Gegensatz zur landläufigen Meinung herausgestellt, daß dieser Grundumsatz durch klimatische Verhältnisse oder durch Veränderungen der Sauerstoffzufuhr fast unbeeinflußt bleibt. Auch bei Krankheiten bewegt er sich im allgemeinen innerhalb der Norm. Noch nicht hinlänglich entschieden ist die fragliche Einschränkung des Ruhestoffwechsels in der Rekonvaleszenz oder bei hochgradiger Unterernährung, die man aus teleologischen Gründen anzunehmen geneigt war. Eine ähnliche Argumentation führte dazu, eine Herabsetzung des Ruhestoffwechsels nach ermüdender Körperanstrengung zu behaupten. Diese aprioristische Deduktion wurde durch Versuche von Pettenkofer und Voit[1]) gestützt, die in der Tat mit ihrer Methode eine Verringerung des Umsatzes bei durch Muskelarbeit erschöpften Individuen nachweisen konnten. Dieses Ergebnis konnte aber außer in einer tatsächlichen Verringerung des Grundumsatzes auch in einer durch Müdigkeit bedingten Einschränkung der Bewegungen seine Ursache haben. Wissen wir doch, daß auch die Regulation der

[1]) Vergl. Literatur, Seite 481.

Wärmebildung im Organismus nicht durch Veränderungen des Grundumsatzes, sondern durch Anpassung der Muskeltätigkeit zustande kommt. Die Zuntzsche Methode, welche die Bestimmung des Ruheumsatzes bei vollständiger Muskelentspannung vornimmt, ist in erster Linie geeignet, diese Frage zu entscheiden. Mit Hilfe dieser Methodik haben Zuntz und Hagemann[2]) in sechs Versuchen den Ruhestoffwechsel von Pferden, die längere Zeit gearbeitet hatten, gemessen und kamen zu Zahlen, welche nur um weniges geringer sind als die Ruhewerte vor der Arbeit. Das beobachtete Absinken des Ruheumsatzes ist, wie sie überzeugend dartun, auf die fortschreitende Verdauung der nicht vollkommen nüchternen Tiere zurückzuführen. Zuntz und Schumburg[3]) haben den Ruheumsatz von Soldaten nach ermüdenden Marschübungen bestimmt und erhielten in zwei Versuchen Werte, die mit den normalen Ruhewerten gut übereinstimmen, in einem dritten Versuche war der Stoffwechsel allerdings ein wenig herabgesetzt. In Beziehung zu dieser Frage stehen auch die Erfahrungen, welche die von Zuntz[4]) geführte Gebirgsexpedition im Jahre 1901 gesammelt hat. Die vom Brienzer Rothorn nach Absolvierung anstrengender Marschübungen in ihr Standquartier nach Brienz zurückgekehrten Teilnehmer hatten in den nächsten Tagen einen Ruheumsatz, der im Vergleiche zu den vor Aufbruch der Expedition gewonnenen Zahlen erheblich herabgesetzt war. Ob diese Erscheinung als Folge der nachwirkenden Ermüdung oder anderer Faktoren zu betrachten ist, soll weiter unten noch eingehender erörtert werden. Daß eine auf eine Ruheperiode folgende längere Arbeitsperiode den Ruheumsatz nicht vermindert, sondern im Gegenteil, (wahrscheinlich wegen der stärkeren Ausbildung der Muskulatur), beträchtlich erhöht, haben Zuntz und Schumburg[3]) beim Menschen und Zuntz[5]) beim Hunde beobachtet.

Die Frage des Ruheumsatzes nach ermüdender Körperanstrengung schien demnach eigens darauf gerichtete Untersuchungen zu erfordern und auf Anregung des Herrn Geh.-Rats Prof. Zuntz haben wir uns dieser Aufgabe unterzogen. Nebenbei richteten wir unser Augenmerk auf das Verhalten des respiratorischen Quotienten, der nach den Befunden der bisherigen Untersuchungen in der auf die Arbeit folgenden Ruhe gewisse Schwankungen zeigt. Anhangsweise teilen wir einige Versuche über den Einfluß der Ermüdung auf den Umsatz bei der Arbeit mit.

I. Einfluß der Ermüdung auf den Ruheumsatz.

Sämtliche Versuche wurden an einem schon vor längerer Zeit tracheotomierten und zu Respirations- und Arbeitsversuchen ähnlicher Art verwendeten Hunde ausgeführt. Das Versuchstier erhielt während der ganzen Versuchsperiode pro Tag ca. 500 g Futter, das aus Reis, Fleischabfällen und Knochen zu etwa gleichen Teilen zusammengesetzt war. In der Generaltabelle ist angegeben, welche Zeit seit der letzten Fütterung verstrichen war. Die Mehrzahl dieser Versuche ist am nüchternen Tiere, d. h. mindestens achtzehn Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme, ausgeführt.

Um den Hund durch eine entsprechende Arbeitsleistung zu ermüden, ließen wir ihn auf einer geneigten Tretbahn stundenlang bergauf laufen. Um Überhitzung, welche beim tracheotomierten Hunde sehr leicht zustande kommt, zu vermeiden, wurde das Tier, besonders an heißen Tagen, öfters kalt gewaschen und erhielt nach Belieben zu trinken. Mit denselben Mitteln suchten wir nach Beendigung der Arbeitsleistung die gewöhnlich etwas erhöhte Temperatur des Versuchstieres möglichst rasch auf die Norm zurückzubringen und begannen den Versuch erst dann, wenn dies erreicht war. Während des Versuches lag der Hund in einem bequemen offenen Holzkasten auf einem Strohkissen, mit leichter Decke bedeckt. Er blieb hier stets regungslos liegen, so daß wir bei unseren stundenlang dauernden Versuchen fast nie durch unruhiges Verhalten des Tieres gestört wurden. Die Dauerkanüle, welche der Hund sonst stets, auch auf der Tretbahn, trug, wurde vor dem Versuche durch eine Tamponkanüle ersetzt, die ihm Außenluft zuführte und die Exspirationsluft in den Gasmesser leitete. Durch eine längere Vorperiode überzeugten wir uns jedesmal von der Gleichmäßigkeit der Atmung. Nur in den letzten Versuchen (13. VIII. Nr. 2, 21. VIII. Nr. 1 und 24. VIII. Nr. 1) wurde der Umsatz in der Zeit unmittelbar nach der Arbeitsleistung gemessen. Die Einzelheiten der Zuntz-Geppertschen Methode, deren wir uns bedienten, sind bei Magnus-Levy (Pflügers Archiv **55**, 1. 1893) ausführlich beschrieben. Die Versuche erstreckten sich auf eine Gesamtzeit von fast drei Monaten (5. Juni bis 24. August). Die Ruhetage während dieser Periode sind aus der Generaltabelle zu ersehen, welche gleichzeitig eine Übersicht über die einzelnen Versuche in chronologischer Reihenfolge gibt.

Generaltabelle der Ruheversuche.

Datum	Versuchs-Nr.	Versuchs-Zeit	Letzte Mahlzeit vor Std.	Gewicht in kg	Ruhezeit[1]) Std.	Ruhezeit[1]) Min.	O-Verbrauch in Prozenten der exspir. Luft %	CO_2-Abgabe in Prozenten der exspir. Luft %	Atemgröße pro Minute in Litern	Pro Minute in cm³ aufgenommener Sauerstoff	Pro Minute in cm³ abgegebene Kohlensäure	Respirat.-Quot.	Pro kg und Minute in cm³ verbrauchter Sauerstoff	Pro kg und Minute in cm³ gebildete Kohlensäure	Arbeitsleistung vor dem Versuche Weglänge in m	Arbeitsleistung vor dem Versuche Steigung[5]) in m	Anmerkung
5. VI.	1	$11^{20}—12^{25}$	**18** *)	10,5	—	—	4,85	3,55	1,45	69,30	51,17	0,74	6,60	4,87	0	0	Ruheumsatz vor Beginn der Versuche.
	2	$12^{40}—1^{10}$	**15**	10,5	—	—	5,29	3,88	1,45	72,70	52,09	0,72	6,92	4,96			
6. VI.	1	$10^{10—37}$	**12**	10,5	—	—	5,09	3,61	1,50	70,97	50,21	0,71	6,76	4,78	0	0	
	2	$12^{38}—1^{09}$	**14**	10,5	—	—	5,12	3,67	1,53	72,49	52,42	0,72	6,90	4,99			
7. VI.	1	$1^{39}—2^{09}$	**15**	10,5	—	—	5,50	3,84	1,37	70,59	45,27	0,70	6,72	4,31	0	0	
	2	$2^{34}—3^{06}$	**16**	10,5	—	—	5,02	3,76	1,40	64,58	48,49	0,75	6,17	4,62			
8. VI.	1	$1^{13—41}$	**15**	10,0	—	—	5,16	3,56	1,45	68,31	47,06	0,69	6,83	4,71	0	0	
	2	$2^{13—26}$	**16**	10,0	—	—	5,02	3,65	1,61	73,50	53,43	0,73	7,35	5,34			
9. VI.	1	$12^{02—30}$	**16**	10,0	—	—	4,88	3,74	1,54	68,94	52,75	0,77	6,89	5,28	0	0	
	2	$2^{00—29}$	18	10,0	—	—	4,94	3,62	1,50	67,58	49,44	0,73	6,75	4,94			
11. VI.	1	$12^{23—53}$	**14**	10,15	—	—	5,41	3,84	1,46	72,58	51,35	0,71	7,15	5,07	0	0	
	2	$1^{25—55}$	**15**	10,15	—	—	5,38	3,93	1,44	70,85	51,86	0,73	6,98	5,10			

*) Die fettgedruckten Zahlen beziehen sich auf Versuche, in denen die umsatzsteigernde Wirkung der Verdauung wahrscheinlich noch nicht abgeklungen war. Sie sind daher in das Mittel der Nüchternversuche nicht einbezogen.

19. VI.	1	5^{25-54}	über	10,0	2	1	4,67	3,11	1,52	63,30	41,78	0,66	6,33	4,18	4588	1338	
	2	6^{06-32}	20 Std.	10,0	2	41	4,62	3,29	1,60	65,75	46,81	0,71	6,58	4,68	4588	1338	
20. VI.	1	4^{24-36}	über	10,0	—	37	2,39	1,72	3,77	80,21	56,72	0,71	8,02	5,67	6408	1869	
	2	4^{50-57}	20 Std.	10,0	1	16	3,00	2,06	2,80	74,58	51,15	0,69	7,45	5,12	6408	1869	
21. VI.	1	5^{7-26}	über	ca.	—	47	3,81	2,51	2,27	77,50	51,03	0,66	7,75	5,10	4982	1452	
	2	5^{37-53}	20 Std.	10 kg	1	19	2,94	2,14	2,54	66,84	48,56	0,78	6,68	4,86	4982	1452	
22. VI.	1	5^{43-52}	über	ca.	—	49	1,71	1,12	4,83	73,43	46,68	0,64	7,34	4,67	6644	1937	
	2	7^{10-37}	20 Std.	10 kg	2	18	4,82	3,40	1,53	65,71	46,52	0,71	6,57	4,65	6644	1937	
23. VI.	1	2^{21-33}	17	ca.	—	24	2,62	2,61	3,72	86,28	51,93	0,60	8,62	5,19	7761	2263	
	2	4^{06-48}	19	10 kg	1	45	4,93	3,54	1,34	58,62	41,71	0,71	5,86	4,17	7761	2263	
25. VI.	1	4^{37}—5^{09}	19	ca.	—	37	5,82	3,96	1,35	71,84	48,90	0,68	7,18	4,89	8434	2460	Spermininjektion [3]
	2	6^{19-49}	20	10 kg	2	17	5,44	3,93	1,47	71,79	51,84	0,72	7,18	5,18	8434	2460	
26. VI.	1	3^{42}—4^{04}	über	ca.	—	31	4,02	2,77	2,03	73,04	50,26	0,69	7,30	5,03	5778	1685	
	2	4^{40}—5^{10}	20 Std.	10 kg	1	29	5,03	3,58	1,34	63,30	44,76	0,71	6,33	4,48	5778	1685	
27. VI.	1	4^{10-21}	über	ca.	—	46	2,66	1,46	3,98	84,29	51,38	0,61	8,43	5,14	9612	2803	Spermininjektion [3]
	2	5^{14-37}	20 Std.	10 kg	1	50	4,44	3,20	1,83	71,77	51,87	0,72	7,18	5,19	9612	2803	

[1]) Ruhezeit = Zeit, welche seit Beendigung der Steigarbeit bis zum Beginn der Versuches verstrichen war.

[2]) Die Steigung war in allen Versuchen 29,16 % des Weges, die Geschwindigkeit betrug durchschnittlich 46 m in der Minute.

[3]) Diese Injektionen wurden zu einem anderen Zwecke während der Arbeit verabfolgt. Die Zahlen dieser Tage sind bei Berechnung der Durchschnittstabellen nicht aufgenommen worden.

Datum	Versuchs-Nr.	Versuchs-Zeit	Letzte Mahlzeit vor Std.	Gewicht in kg	Ruhezeit Std.	Ruhezeit Min.	O-Verbrauch in Prozenten der exspir. Luft %	CO_2-Abgabe in Prozenten der exspir. Luft %	Atemgröße pro Minute in Litern	Pro Minute in cm³ aufgenommener Sauerstoff	Pro Minute in cm³ abgegebene Kohlensäure	Respirat.-Quot.	Pro kg und Minute in cm³ verbrauchter Sauerstoff	Pro kg und Minute in cm³ gebildete Kohlensäure	Arbeitsleistung vor dem Versuche Weglänge in m	Arbeitsleistung vor dem Versuche Steigung in m	Anmerkung
28. VI.	1	4^{00}—13			—	30	2,89	1,78	3,42	86,66	53,35	0,62	8,67	5,34	9030	2633	
	2	4^{40}—5^{01}	über	ca.	1	20	3,71	2,74	1,96	68,81	50,67	0,74	6,88	5,07	9030	2633	
	3	5^{20}—47	20 Std.	10 kg	1	50	4,59	3,24	1,62	65,08	45,84	0,70	6,51	4,58	9030	2633	
	4	6^{06}—30			2	36	4,53	3,22	1,80	71,08	50,21	0,71	7,11	5,02	9030	2633	(Unruhe!)
29. VI.	1	2^{00}—20	16		—	30	2,65	1,63	3,60	83,64	51,33	0,62	8,36	5,13	12860	3750	
	2	2^{40}—50	17	ca.	1	10	1,84	1,31	4,43	71,71	51,04	0,71	7,17	5,10	12860	3750	
	3	3^{26}—50	18	10 kg	1	56	4,24	3,13	1,71	63,93	47,14	0,74	6,39	4,71	12860	3750	
	4	4^{45}—5^{07}	19		3	15	3,60	2,71	1,72	60,86	45,58	0,75	6,09	4,56	12860	3750	
30. VI.	1	10^{37}—11^{06}	18	9,82	20	—	5,16	3,83	1,29	60,87	44,74	0,74	6,20	4,56	0	0	
	2	5^{13}—45	19	9,82	1	—	5,26	3,78	1,30	62,69	44,72	0,71	6,38	4,55	5146	1501	
2. VII.	1	2^{12}—45	16	9,82	48	—	5,44	3,81	1,30	63,01	44,14	0,70	6,42	4,50	0	0	
	2	2^{58}—3^{29}	17	9,82	48	—	4,91	3,78	1,43	65,77	50,68	0,77	6,70	5,16	0	0	
3. VII.	1	2^{26}—59	16	9,82	3 Tage		5,22	3,57	1,30	60,55	41,76	0,69	6,17	4,25	0	0	
	2	3^{19}—39	17	9,82	3 „		4,90	3,68	1,40	62,69	46,85	0,75	6,37	4,77	0	0	
7. VII.	1	2^{46}—3^{17}	16	9,85	7 Tage		5,42	3,76	1,40	68,75	47,67	0,70	6,98	4,84	0	0	

9. VII.	1	10^{32-57}	**18**	10,08	9	Tage	4,89	3,71	1,74	77,01	58,30	0,76	7,64	5,79	0	0	
	2	11^{17-43}	**14**	10,08	9	"	4,97	3,62	1,63	73,39	53,51	0,73	7,28	5,39	0	0	
	3	4^{07-27}	18	10,08	9	"	4,57	3,37	1,75	67,70	49,92	0,72	6,72	4,95	0	0	
	4	6^{08-37}	20	10,08	9	"	5,10	3,49	1,46	66,60	45,64	0,69	6,61	4,53	0	0	
10. VII.	1	10^{19-41}	**12**	10,21	10	Tage	4,34	3,49	1,95	76,49	61,53	0,80	7,49	6,03	0	0	
	2	2^{27-38}	16	10,21	—	22	2,63	1,64	4,04	95,08	59,09	0,62	9,31	5,79	6649	1939	
	3	4^{36-49}	18	10,21	2	31	2,64	1,79	3,18	75,04	50,73	0,68	7,35	4,97	6649	1939	
	4	6^{13-32}	20	10,21	4	8	3,47	2,59	2,08	64,02	47,80	0,75	6,27	4,68	6649	1939	
11. VII.	1	10^{08-34}	**15**	9,85	1	Tag	5,05	3,54	1,61	73,71	51,56	0,70	7,48	5,23	0	0	
	2	5^{00-12}	20	9,85	—	50	2,93	1,80	3,70	96,91	59,63	0,62	9,84	6,05	11602	3383	Spermin-injektion[1]
	3	7^{28-51}	23	9,85	3	12	4,35	3,00	1,86	71,63	49,46	0,69	7,27	5,02	11602	3383	
12. VII.	1	$9^{57}-10^{26}$	**15**	10,01	1	Tag	5,07	3,60	1,53	69,75	49,50	0,71	6,97	4,95	0	0	
	2	2^{08-32}	19	10,01	—	18	4,97	3,35	1,80	81,33	54,78	0,67	8,13	5,48	8550	2493	
	3	4^{07-34}	21	10,01	2	—	4,58	3,21	1,60	64,45	45,22	0,70	6,44	4,52	8550	2493	
	4	$5^{38}-6^{07}$	23	10,01	3	30	4,98	3,51	1,47	65,72	46,29	0,70	6,57	4,63	8550	2493	
13. VII.	1	9^{25-32}	**15**	9,80	1	Tag	5,22	3,75	1,60	75,93	54,49	0,72	7,93	5,56	0	0	
	2	2^{03-27}	19	9,80	—	20	4,63	3,10	1,80	77,18	51,91	0,67	7,87	5,30	8950	2610	
	3	$3^{45}-4^{12}$	20	9,80	2	13	4,77	3,39	1,60	69,41	49,31	0,71	7,08	5,08	8950	2610	
14. VII.	1	$9^{47}-10^{20}$	**15**	9,78	1	Tag	5,47	3,65	1,30	68,75	43,84	0,67	7,07	4,51	0	0	
	2	3^{10-41}	20	9,78	1	"	5,12	3,53	1,30	62,82	43,35	0,69	6,46	4,46	0	0	
	3	$5^{46}-6^{17}$	23	9,78	1	"	5,19	3,62	1,37	64,74	45,13	0,70	6,65	4,64	0	0	

[1]) Vgl. die Anmerkung [5]) S. 457.

Datum	Versuchs-Nr.	Versuchs-Zeit	Letzte Mahlzeit vor Std.	Gewicht in kg	Ruhezeit Std.	Ruhezeit Min.	O-Verbrauch in Prozenten der exspir. Luft %	CO_2-Abgabe in Prozenten der exspir. Luft %	Atemgröße pro Minute in Litern	Pro Minute in cm³ aufgenommener Sauerstoff	Pro Minute in cm³ abgegebene Kohlensäure	Respirat.-Quot.	Pro kg und Minute in cm³ verbrauchter Sauerstoff	Pro kg und Minute in cm³ gebildete Kohlensäure	Arbeitsleistung vor dem Versuche Weglänge in m	Arbeitsleistung vor dem Versuche Steigung in m	Anmerkung
16. VII.	1	10⁴⁸—11²²	über 24 Std.	9,37	3 Tage		5,32	3,97	1,27	61,22	45,22	0,75	6,53	4,83	0	0	
	(2	11³²—12⁰⁷		9,37	3 „		5,21	3,90	1,20	57,66	43,19	0,75	6,15	4,61)	0	0	Analyse ungenau
	3	2⁴⁹—3²¹		9,37	3 „		5,35	3,80	1,30	65,42	45,38	0,71	6,98	4,84	0	0	
	4	6²⁵—59		9,37	3 „		5,48	3,89	1,20	63,26	44,94	0,71	6,75	4,80	0	0	
	5	7⁰⁸—40		9,37	3 „		5,39	3,87	1,30	64,19	46,07	0,72	6,85	4,92	0	0	
18. VII.	1	9⁴²—10¹⁷	über 24 Std.	9,40	5 Tage		5,99	3,99	1,20	66,60	44,33	0,67	7,08	4,72	0	0	
	2	3²³—53		9,40	—	35	5,58	3,71	1,40	70,20	46,67	0,66	7,47	5,20	12521	3651	
	3	5³⁴—6⁰⁴		9,40	2	46	5,18	3,48	1,43	66,31	44,52	0,67	7,05	4,74	12521	3651	
	4	6¹⁰—40		9,40	3	22	5,34	3,66	1,43	68,23	46,68	0,68	7,26	4,97	12521	3651	
20. VII.	1	10²³—56	über 24 Std.	9,75	2 Tage		5,41	4,00	1,30	62,79	46,39	0,74	6,44	4,76	0	0	
	2	4⁵⁵—5²⁶		9,75	1	57	5,27	3,63	1,40	66,50	45,37	0,68	6,82	4,65	9897	2886	
	3	6⁰⁹—41		9,75	3	9	4,92	3,58	1,35	60,12	43,64	0,73	6,17	4,48	9897	2886	
23. VII.	1	10⁴⁵—11¹⁸	über 24 Std.	9,36	3 Tage		5,01	3,56	1,30	59,37	42,22	0,71	6,34	4,51	0	0	
	2	3⁴⁷—4¹⁶		9,36	—	12	5,39	3,51	1,45	70,19	45,22	0,65	7,50	4,83	9723	2835	
	3	7⁵⁰—8²⁰		9,36	4	15	5,22	3,51	1,43	66,75	44,74	0,67	7,13	4,78	9723	2835	

25. VII.	(1	10^{17}—^{39}	?	9,75	2 Tage		4,36	3,84	2,00	78,41	69,00	0,88	8,04	7,08)	0	0	Nüchtern?
	2	7^{08}—^{32}	?	9,75	—	58	4,15	2,80	1,95	72,86	49,04	0,67	7,47	6,19	10057	2933	
	3	8^{04}—^{32}	?	9,75	1	56	4,53	3,23	1,56	63,69	45,46	0,71	6,53	5,74	10057	2933	
27. VII.	1	10^{28}—11^{05}	über 24 Std.	8,85	2 Tage		5,27	3,59	1,18	56,33	36,37	0,68	6,42	4,34	0	0	
	2	12^{44}—1^{20}		8,85	2 „		5,69	3,72	1,18	60,55	39,56	0,65	6,84	4,47	0	0	
	3	4^{52}—5^{28}		8,85	—	52	5,23	3,44	1,40	64,91	42,71	0,66	7,33	4,83	7105	2072	
	4	6^{01}—^{32}		8,85	2	—	5,27	3,68	1,42	66,64	47,23	0,71	7,58	5,34	7105	2072	
28. VII.	1	9^{09}—^{32}	1/2 Std.	10,30	1 Tag		5,50	3,90	1,90	94,44	66,98	0,71	9,17	6,50	0	0	
	2	11^{53}—12^{05}	3 1/2 Std.	10,30	—	19	3,53	2,05	3,80	119,92	69,55	0,58	11,64	6,75	4548	1326	
	3	2^{17}—^{29}	5 Std.	10,30	2	43	2,85	2,12	3,82	97,13	71,08	0,73	9,43	6,90	4548	1326	
	4	4^{00}—^{10}	7 1/2 Std.	10,30	4	26	2,81	2,23	4,44	111,40	88,15	0,79	10,81	8,56	4548	1326	
31. VII.	1	10^{20}—^{55}	2 Tage	9 (?)	2 Tage		5,50	3,60	1,22	59,51	38,97	0,65	6,61	4,33	0	0	
	2	4^{51}—5^{09}	2 „	9 (?)	1	21	2,70	2,23	2,51	59,70	49,25	0,83 (?)	6,63	5,47	8306	2422	
3. VIII.	1	10^{50}—11^{26}	über 24 Std.	9 (?)	3 Tage		5,07	3,70	1,24	55,95	40,87	0,73	6,21	4,54	0	0	
	2	12^{14}—^{45}			3 „		5,08	3,56	1,40	62,62	43,92	0,70	6,95	4,88	0	0	
	3	1^{51}—2^{25}			3 „		5,14	3,63	1,26	58,04	40,93	0,70	6,45	4,55	0	0	
8. VIII.	1	11^{28}—12^{02}	über 24 Std.	9,05	8 Tage		5,83	4,02	1,25	67,33	46,45	0,69	7,44	5,16	0	0	
	2	1^{11}—^{45}		9,05	8 „		5,15	3,83	1,30	62,49	46,02	0,74	6,90	5,10	0	0	
	3	3^{28}—4^{02}		9,05	8 „		5,24	3,81	1,29	62,13	45,01	0,72	6,86	5,00	0	0	
9. VIII.	1	11^{19}—^{53}	2 Tage (?)	8,70	9 Tage		5,94	4,18	1,29	69,34	48,79	0,70	7,97	5,61	0	0	
	2	12^{54}—1^{24}	2 „	8,70	9 „		5,35	3,73	1,44	70,19	48,90	0,70	8,07	5,62	0	0	
	3	5^{42}—6^{14}	2 „	8,70	9 „		5,45	3,93	1,34	66,31	47,78	0,72	7,62	5,49	0	0	
	4	6^{32}—7^{05}	2 „	8,70	9 „		5,54	4,01	1,34	66,85	48,33	0,72	7,68	5,56	0	0	

Datum	Versuchs-Nr.	Versuchs-Zeit	Letzte Mahlzeit vor Std.	Gewicht in kg	Ruhezeit Std.	Ruhezeit Min.	O-Verbrauch in Prozenten der exspir. Luft %	CO_2-Abgabe in Prozenten der exspir. Luft %	Atemgröße pro Minute in Litern	Pro Minute in cm^3 aufgenommener Sauerstoff	Pro Minute in cm^3 abgegebene Kohlensäure	Respirat.-Quot.	Pro kg und Minute in cm^3 verbrauchter Sauerstoff	Pro kg und Minute in cm^3 gebildete Kohlensäure	Arbeitsleistung vor dem Versuche Weglänge in m	Arbeitsleistung vor dem Versuche Steigung in m	Anmerkung
11. VIII.	1	10^{12-39}	?		2 Tage		5,52	4,23	1,60	80,66	60,38	0,77	8,06	6,03	0	0	
	2	11^{20-47}	?	ca.	2 „		4,90	3,72	1,61	71,90	54,64	0,76	7,19	5,46	0	0	
	3	3^{15-47}	?	10 kg	2 „		5,29	4,00	1,33	64,31	48,55	0,76	6,43	4,86	0	0	
	4	4^{24-56}	?		2 „		5,30	3,95	1,35	65,58	48,79	0,74	6,56	4,88	0	0	
13. VIII.	1	$11^{50}-12^{25}$			4 Tage		5,46	3,94	1,22	61,65	44,46	0,68	6,17	4,45	0	0	
	2	—	über	ca.	—	8	5,60	3,56	2,00	101,70	64,24	0,64	10,17	6,42	9553	2768	
	3	—	20 Std.	10 kg	—	35	4,51	3,10	1,90	77,71	53,42	0,69	7,77	5,34	9553	2768	
	4	—			1	27	4,29	2,96	1,50	58,41	40,36	0,69	5,84	4,04	9553	2768	
21. VIII.	1	4^{39-45}	über		—	6	1,90	1,20	8,16	142,10	87,42	0,62	14,21	8,74	14173	4133	
	2	4^{51-56}	20 Std.	ca.	—	18	1,91	1,28	5,88	114,73	76,51	0,67	11,47	7,65	14173	4133	
	3	5^{05-16}	21 Std.	10 kg	—	32	2,42	1,54	4,05	89,95	56,64	0,63	8,99	5,66	14173	4133	
	4	5^{26-47}	21 „		—	53	4,12	2,85	2,10	79,13	54,71	0,69	7,91	5,47	14173	4133	
	5	6^{07-22}	22 „		1	36	4,92	3,47	1,66	75,40	53,05	0,70	7,54	5,31	14173	4133	
24. VIII.	1	$3^{58}-4^{21}$	18 Std.	ca.	0 [1])		5,14	3,33	2,57	120,27	77,86	0,65	12,03	7,79	13410	3910	
	2	4^{24-34}	19 „	10 kg	—	26	4,93	3,37	1,82	82,47	56,29	0,68	8,25	5,63	13410	3910	

[1]) **Dieser Versuch wurde bereits während der Arbeit begonnen, vgl. Text S. 469.**

A. Versuche am nüchternen Tiere.

Zur Beantwortung der oben erörtertern Hauptfrage unseres Themas müssen die Werte für den Ruheumsatz des Hundes im frischen und ermüdeten Zustande verglichen werden. Unter der Voraussetzung, daß stets dasselbe Material im Organismus verbrannt wird, ist der Sauerstoffverbrauch ein Maß für den Stoffumsatz. In unseren Versuchen, die am nüchternen Tiere, das im wesentlichen seine Energie aus dem Körperfett bestreitet, ausgeführt waren, trifft diese Voraussetzung zu. Aber auch in den Versuchen am verdauenden Tiere kann bei gleichmäßiger Ernährung der Sauerstoffverbrauch als Vergleichszahl für den Stoffumsatz eintreten.

Der Durchschnitt des Grundumsatzes unseres Versuchstieres in vollkommen nüchternem, nicht ermüdetem Zustande berechnet sich entsprechend folgenden Werten*):

Ruheumsatz.

Durchschnittl. Gewicht	O-Verbrauch in Prozent. der exspir. Luft	CO_2 Abgab. in Prozent. der exspir. Luft	Atemgröße pro Min. in Litern	Pro Minute cm^3 aufgenomm. Sauerstoff	Pro Minute cm^3 abgegebene Kohlensäure	Respirat. Quot.	Zahl der Versuche
9,3 kg	5,36 %	3,78 %	1,35	68,60	45,04	0,70	25

Der Grundumsatz des ermüdeten Tieres ist am besten aus nachfolgender Spezialtabelle zu beurteilen. Die dort angeführten Zahlen sind jedesmal Durchschnittswerte aus einer Anzahl von Versuchen, die annähernd gleiche Zeit nach der Arbeit begonnen waren.

Durchschnittswerte, nach der Ruhezeit geordnet.

Ruhezeit	Atemgröße pro Minute in Litern	Aufgenomm. Sauerstoff pro Minute in ccm	Abgegebene Kohlensäure pro Minute in ccm	Respirat. Quotient	Zahl der Versuche
0—10 Min.	4,24	121,02	76,50	0,64	3
10—20 „	2,74	85,85	57,10	0,66	4
20—40 „	2,80	81,88	53,63	0,66	10
40—60 „	2,65	73,74	48,78	0,66	4
1—1½ St.	2,43	67,28	47,75	0,71	6
1½—2 „	1,54	65,54	46,38	0,71	8
2—3 „	1,56	66,04	46,10	0,70	4
3—5 „	1,58	64,28	45,79	0,71	7

*) Die Zahlen, welche wir in der ersten Ruheperiode vor Beginn

Diese Durchschnittswerte sind mit Weglassung der Versuche, bei welchen irgendein komplizierender Faktor vorlag, gewonnen. Sie ergeben, daß zu keinem Zeitpunkte eine Herabsetzung des Umsatzes während der Ruhe nach ermüdender Arbeitsleistung zu beobachten ist. Auch die kleinsten Zahlen für den Sauerstoffverbrauch nach der Arbeit (58,82, 59,70 und 58,41) sind nicht niedriger als die kleinsten vor derselben (56,33, 55,94 und 58,04). Zum Vergleiche wollen wir hier die Zahlen von Zuntz und Hagemann und Zuntz und Schumburg anführen. Die ersteren fanden beim Pferde den Ruheumsatz als Mittel aus sechs Versuchen entsprechend folgenden Werten:

Vor der Arbeit.		Nach der Arbeit.		
Sauerstoff pro Min. und kg Körpergew.	Resp. Quot.	Sauerstoff pro Min. und kg Körpergew.	Resp. Quot.	Durchschnittliche Arbeitsdauer
4,083	0,987	4,027	0,924	71 Min.

Der Rückgang des Sauerstoffverbrauchs um ca. 1,4 % nach der Arbeit ist hier die Folge der fortschreitenden Verdauung der nicht ganz nüchternen Tiere. Demnach hatte beim Pferde mäßig anstrengende Arbeit keinen Einfluß auf den Ruheumsatz. Zuntz und Schumburg teilen Zahlen über den Einfluß der Ermüdung auf den Ruheumsatz des Menschen mit.

	Vor der Arbeit.			Nach der Arbeit.		
Versuchsperson	Sauerstoffverbrauch	Resp. Quot.	Durchschnitt aus Zahl der Versuche	Sauerstoffverbrauch	Resp. Quot.	Durchschnitt aus Zahl der Versuche
Herr P.	283,02 cm^3	0,81	20	289,55 cm^3	0,76	6
„ B.	252,59 „	0,836	26	252,1 „	0,73	1
„ B.				(217,1) „	(0,76)	(1)

Wie sich aus diesen Zahlen ergibt, ist bei der Versuchsperson P. der Ruheumsatz im Bereiche der normalen Schwankungen gleich geblieben, was noch deutlicher zum Ausdruck kommt, wenn die Zahlen für Sauerstoffverbrauch mit Hilfe des respirato-

der eigentlichen Versuche erhielten, sind zu hoch, weil der den Umsatz erhöhende Einfluß der Verdauungstätigkeit, wie wir uns später überzeugten, noch nicht abgeklungen war. Sie sind daher in den Durchschnitt nicht einbezogen.

rischen Quotienten auf Kalorien umgerechnet werden. Zuntz und Schumburg berechnen den Umsatz vor dem Marsch auf 1362 Kalorien, nach dem Marsche auf 1376 Kalorien, also Zahlen, die untereinander sehr gut übereinstimmen. Bei B. liegen nach der Arbeit nur zwei hintereinander angestellte Versuche vor. Im ersten war der Sauerstoffverbrauch innerhalb der Norm, im zweiten Versuche abnorm niedrig. Die Autoren messen ihm nur geringe Bedeutung bei, da er mit allen übrigen Versuchen und auch mit dem unmittelbar vorhergehenden im Widerspruche steht, und beziehen ihn auf Versuchsfehler.

Im speziellen wollen wir zunächst den Einfluß der einzelnen Faktoren auf Sauerstoffverbrauch, Kohlensäureabgabe und das Verhältnis beider näher betrachten, die Einwirkung der Ermüdung auf die Atmung erörtern, schließlich die Veränderung des Umsatzes nach einer längeren Arbeits- oder Ruheperiode an der Hand unserer Zahlen untersuchen.

Sauerstoffverbrauch.

Die Abhängigkeit dieser Größe von der auf die Arbeit folgenden Ruhedauer wird am besten durch obenstehende Tabelle illustriert. Wie die Tabelle zeigt, ist der Sauerstoffverbrauch unmittelbar nach der Arbeit gegenüber der Norm bedeutend erhöht, in den ersten 10 Minuten um 90 %, dann um 37 %, sinkt aber ziemlich schnell ab, sodaß die Erhöhung in der 3. bis 5. Stunde nur mehr 1 % des Grundumsatzes ausmacht. Eine Erhöhung als Nachwirkung der Arbeit wurde schon von Speck[6]), Katzenstein[7]), A. Löwy[8]), Lehmann und Zuntz[9]), Zuntz und Schumburg, Zuntz, Löwy, Müller und Caspari[4]) beim Menschen, von Zuntz und Lehmann[10]) sowie Zuntz und Hagemann[9]) beim Pferde beobachtet.

In unseren Versuchen ist sie durchschnittlich noch bis zur 3. Stunde deutlich wahrnehmbar, was mit der höhergradigen Ermüdung zusammenhängen dürfte. Schon die genannten Autoren führen den erhöhten Stoffverbrauch in der nach angestrengter Arbeit folgenden Ruhezeit zum Teil auf gesteigerte Herz- und Atemtätigkeit zurück. Wie lange die Erhöhung der Herztätigkeit nach der Arbeit andauert, ist schwer zu bestimmen. Der Einfluß der erhöhten Atemtätigkeit läßt sich aus den Zahlen für die Atemgröße beurteilen. Sie zeigen uns, daß im Vergleiche zu den Ruheversuchen am ermüdeten Tiere die Atmung bis zur 5. Stunde ge-

steigert war, in den ersten 1 1/2 Stunden nach beendeter Steigarbeit sogar in erheblichem Maße. Über den Einfluß der Atemarbeit auf den Stoffverbrauch des Hundes liegen keine Versuche vor. Wohl aber hat sich beim Pferde (Zuntz und Hagemann) für 1 l Mehrventilation ein Mehrverbrauch von 4—5 cm^3 Sauerstoff, beim Menschen von 5—10 cm^3 Sauerstoff ergeben (A. Löwy). Daraus schätzt Zuntz[20]) den Mehrverbrauch des Hundes für 1 l Lungenventilation auf 5—10 cm^3 Sauerstoff. Ziehen wir diesen Betrag für die Mehrventilation in unseren Versuchen gegenüber der Ventilation beim nicht ermüdeten Tiere (1,35 l) von den beobachteten Zahlen des Sauerstoffverbrauchs ab, so ergeben sich folgende Werte:

Ruhezeit	Mehrventilation	Auf 1,35 l Ventilation reduzierter O-Verbrauch (für 0,2 l Ventilation ist 1 cm^3 Sauerstoff abgezogen)
0—10 Min.	2,89	106,57 cm^3
10—20 „	1,39	78,80 „
20—40 „	1,45	74,63 „
40—60 „	1,30	67,24 „
1—1 1/2 Std.	1,08	61,88 „
1 1/2—2 „	0,19	64,59 „
2—3 „	0,21	64,99 „
3—5 „	0,23	63,13 „

Es ergibt sich daraus, daß der Grundumsatz nach Abzug des Aufwandes für die Mehrventilation in Wirklichkeit nur während der ersten Stunde gesteigert war und zwar in den ersten 10 Minuten um 67,65 %, von der 10.—20. Minute um 23,89 %, von der 20.—40. Minute um 17,34 %, endlich von der 40.—60. Minute um 5,7 %.

Als Ursache dieser Steigerung wäre neben verstärkter Herzarbeit an die erhöhte Körpertemperatur zu denken. Wie wir schon eingangs erwähnen, wurden die Versuche erst begonnen, nachdem die Rektaltemperatur unter 39,5° abgesunken war, nur bei den Versuchen, deren Beginn in die ersten 10 Minuten fällt, mußte auf die Temperaturmessung verzichtet werden. Wie wir aber bei anderen Versuchen ermittelt hatten, ist die Temperatur unmittelbar nach der Arbeit bis um 2° erhöht, so daß die Steigerung des Umsatzes in den ersten 10 Minuteu zum großen Teil auf Hyperthermie zu beziehen ist. Dasselbe dürfte aber auch für die Versuche, die wir erst nach Absinken der Rektaltemperatur auf die Norm begonnen hatten,

Geltung haben, denn selbst bei normaler Rektumtemperatur kann die Temperatur im Innern der Muskulatur erhöht sein. Vielleicht spielen hier auch noch unbekannte toxische Substanzen (Ermüdungsgifte) eine gewisse Rolle.

Die Intensität der Arbeit hatte in den Versuchen keinen wahrnehmbaren Einfluß, wie aus den Tabellen leicht zu ersehen ist:

Die Kohlensäureausscheidung

zeigt ungefähr dasselbe Verhalten wie der Sauerstoffverbrauch. Ihre Werte gehen ebensowenig unter die Norm herab, wie die des Sauerstoffverbrauches; wie dieser ist die Kohlensäurebildung in der ersten Zeit nach der Arbeit erhöht, um dann zur Norm abzufallen, jedoch ohne mit der Sauerstoffaufnahme gleichen Schritt zu halten, was aus dem Verhalten des respiratorischen Quotienten hervorgeht.

Der respiratorische Quotient,

der in den ersten Minuten nach der Arbeit auffallend niedrig ist (in der Durchschnittstabelle 0,64), zeigt noch bis zum Ende der ersten Stunde kleine Werte, und geht dann zur Norm zurück. Der kleinste Wert, den wir beobachten konnten, war 0,60*). Dieses Absinken des respiratorischen Quotienten nach anstrengender Arbeit hatten schon die oben genannten Autoren beobachtet.

In ihren Versuchen erfolgte unmittelbar nach der Arbeit zunächst ein bedeutender Anstieg des respiratorischen Quotienten, darauf ein Abfall unter die Norm.

A. Löwy erklärt die erwähnten Schwankungen des respiratorischen Quotienten aus Änderungen der Atemgröße. Nach Beendigung der Arbeit kehren Atmung und Zirkulation nicht sofort zur Norm zurück, sondern sind je nach Anstrengung und Ermüdung längere oder kürzere Zeit gesteigert, weil, wie Zuntz und Geppert gezeigt haben, während der Muskeltätigkeit gebildete Stoffe, die einen Reiz für das Atemzentrum bilden, noch in Zirkulation sind. Vermehrte Atmung und bessere Zirkulation bedingen eine bessere Ventilation des Blutes und dadurch eine erhöhte Ausfuhr von Kohlensäure, deren Abgabe bekanntlich von der Differenz ihrer Spannung im Blute und in der Alveolarluft abhängt; diese Mehrausfuhr der Kohlensäure muß den respiratorischen Quotienten in die Höhe treiben. Wenn sich nachher Respiration und

*) Der Wert 0,58 vom 28. VII. wurde nur in diesem einen Versuche, der in die Verdauungszeit fällt, beobachtet.

Zirkulation allmählich verlangsamen, sind die Bedingungen für die Kohlensäureausfuhr wieder ungünstiger als vorher, es wird Kohlensäure im Blute und in den Geweben zurückgehalten, bis der Kohlensäuregehalt wieder auf den Normalwert zurückgekehrt ist; der respiratorische Quotient sinkt ab. Daß die Änderungen der Ventilation tatsächlich die bezeichnete Schwankung des respiratorischen Quotienten herbeiführen können, haben kürzlich Bornstein und v. Gartzen[12]) durch eigene Versuche bewiesen, in denen sie ihr Atemvolumen willkürlich änderten. Das von den früheren Autoren beobachtete Ansteigen des respiratorischen Quotienten unmittelbar nach der Arbeit haben wir in unseren Versuchen vermißt. Diese Versuche waren aber zu einer Zeit begonnen, zu der bei Speck, Katzenstein und Löwy, Zuntz und seinen Mitarbeitern die Erhöhung des respiratorischen Quotienten bereits einem Absinken unter die Norm gewichen war.

Einen Anhaltspunkt könnte uns in dieser Hinsicht ein Vergleich der Ventilation unmittelbar vor dem Versuche und während des Versuches liefern. Denn war das Atemvolumen vor dem Versuche wesentlich größer als während desselben, so ist der niedrige respiratorische Quotient auf eine Zurückhaltung von Kohlensäure infolge verlangsamter Ventilation zurückzuführen. Aus unseren Versuchsprotokollen ist eine Überventilation in den Ruheminuten unmittelbar vor dem Versuche nicht zu ersehen. Gerade die 4 Versuche mit den niedrigsten respiratorischen Quotienten ergeben sogar sämtlich in den der Probenahme vorangehenden Minuten etwas niedrigere Lungenventilation als während derselben.

Allerdings hätte eine noch weiter zurückliegende Mehrventilation eine derartige Auspumpung der Blutkohlensäure bewirken können, daß die darauf folgende Zurückhaltung sich noch bis in den Versuch hinein erstreckte.

Um über diese Verhältnisse weiteren Aufschluß zu gewinnen, haben wir einen Ruheversuch unmittelbar an die Steigarbeit angeschlossen. Der respiratorische Quotient mußte in einem solchen Versuche durch Mehrventilation erhöht sein, falls nicht die Überventilation durch nachfolgendes geringeres Atemvolumen bereits kompensiert war. Wir begannen mit der Entnahme der Gasprobe, während der Hund noch im vollen Laufe war, stellten hierauf die Tretbahn ab und dehnten den Versuch auf die ersten Minuten der Ruhe aus. Der Versuch ergab folgende Zahlen:

Datum	Versuchszeit	O-Verbrauch in Prozenten der exspir. Luft	CO_2-Abgabe in Prozenten der exspir. Luft	Atemgröße pro Min.	Aufgenommener Sauerstoff	Abgegebene Kohlensäure	Respirat. Quot.
24. VIII.	3 58—4 21	5,14 %	3,33 %	2,57	120,27	77,86	0,65

Im vorhergehenden Laufversuche hatten wir folgende Werte:

Datum	Versuchszeit	O-Verbrauch in Prozenten der exspir. Luft	CO_2-Abgabe in Prozenten der exspir. Luft	Atemgröße pro Min.	Pro Minute in cm^3 Aufgenommener Sauerstoff	Pro Minute in cm^3 abgegebene Kohlensäure	Respirat. Quot.
24. VIII.	3 40—47 ½	5,10 %	3,84 %	8,53	400,00	300,20	0,75

Der Vergleich der beiden respiratorischen Quotienten ergibt, daß auch in diesem Versuche die Zahl nach der Arbeitsleistung eine niedrigere ist, als während derselben. Eine durch Überventilation hervorgerufene Steigerung unmittelbar nach dem Laufen kann hier also nicht die Ursache des beobachteten Absinkens sein. Es bleibt nun noch die Möglichkeit, daß eine Verringerung der Ventilation in der Ruhe im Vergleiche zur vorangehenden Laufperiode die Zurückhaltung der Kohlensäure und damit das Absinken des respiratorischen Quotienten verursacht haben kann.

Dafür, ob die Ventilation dem Sauerstoffbedarf entspricht. gibt das prozentuale Sauerstoffdefizit in der Exspirationsluft einen Anhalt. Dieses Defizit ist im Ruhe- und im Laufversuch fast gleich (5,14 × 5,10 %). Doch bleibt zu erwägen, daß die für die Kohlensäureabgabe des Blutes maßgebende Zusammensetzung der Luft in den Lungenalveolen nur so lange der Exspirationsluft parallel geht, wie die Atemtiefe unverändert bleibt. Diese aber nimmt alsbald nach dem Stillstande des Tieres infolge der Wärmetachypnoe erheblich ab.

Die Beobachtung zeigte uns auch tatsächlich, daß unser Tier tachypnoisch war. Wir beobachteten nach dem Stehenbleiben 49 Atemzüge in der Minute, was für den einzelnen Atemzug ein Volumen von ca. 53 cm^3 ausmacht. Mithin war die Atmung sehr oberflächlich und deshalb wahrscheinlich die Ventilation im Vergleich zum vorangehenden Laufversuche, bei welchem die Atmung sehr tief war, verringert, obzwar die Prozentzahlen des verbrauchten Sauerstoffes in beiden Versuchen von gleichem Betrage sind. Da aber bei herabgesetzter Ventilation der Alveolen Kohlensäure im Blute zurückgehalten wird, muß der respiratorische Quotient sinken.

Auch in unseren anderen Versuchen dürfte der unternormale respiratorische Quotient wenigstens teilweise auf die durch Wärmetachypnoe verursachte Zurückhaltung der Kohlensäure zurückzuführen sein. Dafür spricht wenigstens die Beobachtung, daß die niedrigen respiratorischen Quotienten fast regelmäßig mit einer niedrigen Prozentzahl der Respirationsluft an aufgenommenem Sauerstoff und an abgegebener Kohlensäure einhergehen. Mit der Tachypnoe steigt nämlich das Atemvolumen, während die tatsächliche Ventilation der Alveolen sinken kann. So finden wir für das Mittel der Prozentzahlen an Sauerstoff und Kohlensäure bei einem durchschnittlichen respiratorischen Quotienten von weniger als 0,65, und großem Atemvolumen (4,11 l) kleinere Werte als bei einem respiratorischen Quotienten von über 0,65 und kleinerem Atemvolumen (1,68, 1,71), was folgende kleine Übersichtstabelle lehrt:

RQ	Sauerstoffverbrauch	Kohlensäureabgabe	Atemvolum in Litern	Mittel aus Versuchen
	in Prozenten der Exspirationsluft			
unter 0,65	2,85	1,89	4,11	10
0,65—0,70	4,90	3,34	1,68	44
über 0,70	4,74	3,46	1,71	57

In erster Llnie aber ist wohl in den meisten Versuchen, abgesehen von dem eben besprochenen, für den beobachteten niedrigen respiratorischen Quotienten der schon oben erwähnte Zusammenhang verantwortlich zu machen, daß während der Arbeit eine Verarmung des Blutes und der Gewebe an Kohlensäure zustande kommt, welche in der nachfolgenden Ruheperiode durch Zurückhaltung von CO_2 wieder ausgeglichen wird. Diese Vermutung findet eine Stütze in den Untersuchungen von Geppert und Zuntz[11]), welche gefunden haben, daß während der Arbeit die Atmung über das Bedürfnis hinaus gesteigert ist. Dies zeigt in unseren Versuchen schon der Vergleich der Prozentzahlen für das Sauerstoffdefizit in Ruhe- und Arbeitsversuchen (5,36% in dem ersteren, 4,31% in dem letzteren Falle, vgl. Tabelle der Arbeitsversuche). In den oben erwähnten Arbeiten von Speck, Katzenstein usw. handelte es sich im Gegensatz zu unseren Beobachtungen um kurz dauernde Versuche, in denen die Erschöpfung des Blutes an CO_2 noch nicht eintreten konnte. In den späteren Arbeitsstadien wird überdies durch Überhitzung die Ventilation

noch in erheblicherem Maße gesteigert. So beobachteten wir im Mittel der zusammengehörigen Arbeitsversuche am Beginn der Arbeit 4,28 %, am Ende der Arbeit 3,51 % Sauerstoffdefizit. Dazu kommt noch, daß die durch die Körperanstrengung verursachte Abnahme der Blutalkaleszenz [Zuntz und Geppert[11]), Cohnstein[14]] die Bindungsfähigkeit des Blutes für Kohlensäure verringert und auf diese Art zu einer Auspumpung der Kohlensäure führt. Nach Beendigung der Arbeit halten diese Bedingungen noch kurze Zeit an, bald aber wird die Ventilation geringer, durch Oxydation der sauren Produkte kehrt die Alkaleszenz zur Norm zurück, beides Ursachen für eine Zurückhaltung von Kohlensäure.

Nicht unerwähnt mag bleiben, daß auch die intermediäre Bildung von sauerstoffreicheren aus sauerstoffärmeren Stoffen beim Absinken des respiratorischen Quotienten beteiligt sein könnte, z. B. der Ersatz des erschöpften Glykogenvorrates aus Eiweiß oder Fett (Magnus-Levy)[15]).

So fand Zuntz in der Tat beim hungernden Hunde, bei welchem durch Phloridzin Zucker entzogen und so eine Neubildung von Zucker aus Fett oder Eiweiß angeregt wurde, einen respiratorischen Quotienten von 0,66 bis 0,63. Aus einem derartigen Vorgange dürften sich nach Magnus-Levy auch die niedrigen respiratorischen Quotienten mancher Diabetiker erklären lassen.

Lehmann und Zuntz führen auf einen ähnlichen Vorgang die von ihnen beobachteten abnorm niedrigen respiratorischen Quotienten zweier hungernder Menschen zurück.

Die Atmung während der Ermüdung.

Das Wichtigste über die Atmung während der Ermüdung ist schon im Vorangehenden gesagt worden. Danach war die Atemgröße außer von der Menge der Stoffwechselprodukte noch abhängig von dem Bedürfnis, Wärme abzugeben. Die niedrigsten Prozentzahlen für aufgenommenen Sauerstoff und abgegebene Kohlensäure der Exspirationsluft wurden daher in den Versuchen beobachtet, in denen ein Mißverhältnis zwischen Wärmeproduktion und Möglichkeit, die Wärme abzugeben, bestand, in der ersten Zeit nach vollendeter Steigarbeit an heißen Tagen. Wir hatten leider keine Gelegenheit, die Zahl der Atemzüge zu registrieren, notierten aber allemal in den Versuchen, die ein großes Atemvolumen, aber kleine Prozentzahlen an ausgeschiedener Kohlensäure und aufgenomme-

nem Sauerstoff zeigten, eine sehr frequente Atmung. Ein ausgesprochenes „Hacheln“, d. h. Wärmetachypnoe konnten wir an besonders heißen, schwülen Tagen beobachten.

Weiter wirkt auch die von Zuntz und Geppert nachgewiesene Anwesenheit von während der Arbeit gebildeten Reizstoffen steigernd auf die Atmung. Von Interesse ist es, daß sogar noch 5 Stunden nach beendeter Arbeit im Mittel der Versuche eine Steigerung der Ventilation um 17 % zu beobachten ist.

Im Zustande der Ermüdung hatte das Versuchstier zuweilen eine an den Cheyne-Stokesschen Atemtypus erinnernde Atmung. Auch bei normalen, nicht ermüdeten Tieren und ebenso bei Menschen werden nach Zuntz und Geppert[11]) sowie Mosso[15])[21]) gewisse Schwankungen der Atemgröße beobachtet. Bezüglich der Erklärung dieses Phänomens verweisen wir auf die genannten Arbeiten. Hier seien nur einzelne Reihen aus unseren Versuchsprotokollen mitgeteilt, aus denen das periodische Anschwellen und Abklingen der Atemgröße deutlich zu ersehen ist.

20. VI., 40 Min. nach geleisteter Steigarbeit.

Zeit	Atemvolumen in Litern
4^{12}	3,0
4^{13}	3,0
4^{14}	4,4
4^{15}	4,2
4^{16}	5,0
4^{17}	4,1
4^{18}	2,4
4^{19}	3,1
4^{20}	4,1
4^{21}	4,5
4^{23}	3,0 3,0 } 6,0
4^{24}	3,9
4^{26}	3,45 3,45 } 6,9
4^{28}	4,15 4,15 } 8,3
4^{29}	4,6
4^{30}	4,7
	(tiefer Atemzug)
4^{31}	2,4
4^{32}	2,6
4^{34}	3,4 3,4 } 6,8
4^{35}	4,2
4^{36}	4,5

23. VI., 20 Min. nach geleisteter Steigarbeit.

Zeit	Atemvolumen in Litern
2^{17}	2,0
2^{18}	2,3
2^{19}	2,6
2^{20}	3,0
2^{21}	2,8
2^{23}	3,2 3,2 } 6,4
2^{24}	3,8
2^{25}	3,3
2^{26}	4,1
2^{27}	3,4
2^{28}	3,4

27. VI., 1 Std. 50 Min. nach geleisteter Steigarbeit.

Zeit	Atemvolumen in Litern
5^{14}	2,6
5^{16}	3,5
5^{18}	3,8
5^{20}	4,1
5^{22}	3,9
5^{24}	3,9
5^{26}	2,9
5^{28}	3,1
5^{30}	3,6
5^{32}	4,0
5^{34}	3,7
5^{36}	3,6

Einfluß einer Reihe von Arbeitstagen auf den Ruheumsatz.

Nachdem es sich herausgestellt hatte, daß die Ermüdung den Ruheumsatz nicht einzuschränken vermag, war noch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß eine längere Periode von Laufübungen allmählich den Stoffwechsel zu ändern imstande ist. Eine teleologische Betrachtungsweise läßt einen solchen Vorgang plausibel erscheinen. Über diese Frage liegen, wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, zwei Untersuchungen vor. Zuntz und Schumburg[3]) fanden bei ihrer ersten Versuchsperson, Herrn P., am Schlusse einer Periode von anstrengenden Marschübungen im Mittel einen Ruheumsatz von 287 cm³ O-Verbrauch gegen 278 cm³ im Beginne des Trainings. Herr B., die andere Versuchsperson, hatte 240 cm³ Sauerstoffverbrauch vor, 267 cm³ nach der Marschperiode. Das Körpergewicht betrug am Beginne bei P. 68,84 kg, bei B. 64,24 kg, am Ende der Marschperiode 68,88 kg bei P., 62,99 kg bei B. Ihr Umsatz hatte also nicht nur nicht abgenommen, sondern war nicht unerheblich gestiegen, was noch mehr hervortritt, wenn der Umsatz auf Körperkilogramme berechnet wird.

Versuchsperson	Vor den Versuchen cm³ O pro kg Körpergew. u. Min.	Nach den Versuchen cm³ O pro kg Körpergew. u. Min.
Herr P.	4,04	4,30
„ B.	3,74	4,24

Zuntz und Schumburg beziehen diese Stoffwechselsteigerung auf Zunahme der Muskulatur, also Ansatz von atmendem Protoplasma, während der Fettvorrat, wie sie zeigen, zurückgegangen war. Einen zweiten hierher gehörigen Versuch von Zuntz teilt Slowtzoff[5]) mit. Ein Hund, der lange Zeit im Käfig eingesperrt und so an jeder ausgiebigen Bewegung gehindert war, wurde durch drei Wochen zu täglicher anstrengender Steigarbeit veranlaßt. Der Ruheumsatz am Beginne der Laufperiode betrug entsprechend 161,1 cm³ O, am Schlusse entsprechend 180,4 cm³ O. Es hatte also auch in diesem Versuche der Ruheumsatz durch das Training eine Steigerung erfahren.

Auf Körperkilogramme berechnet:

Beginn der Laufperiode.		Schluß der Laufperiode.	
Körpergew. (kg)	Sauerstoffverbrauch pro kg u. Minute	Körpergew. (kg)	Sauerstoffverbrauch pro kg u. Minute
28,35	14,15	27,60	16,02

Schließlich sind noch die Erfahrungen zu erwähnen, welche die von Zuntz[4]) geleitete Hochgebirgsexpedition gesammelt hatte. Die Teilnehmer der Expedition (Kolmer, Müller und Löwy) hatten vor der Tour in Berlin einen Ruheumsatz von durchschnittlich 247,7 cm³ bei 0,80 R. Q., in Brienz von 235,1 cm³ bei 0,79 R. Q., nach einer Periode von Märschen und Touren am Brienzer Rothorn einen durchschnittlichen Verbrauch von 221,0 cm³ bei 0,79 R. Q. Der Umsatz war also erheblich zurückgegangen. Dies muß jedoch, wie sich aus Versuchen an den in Brienz zurückgebliebenen Teilnehmern der Expedition ergibt, dem Einflusse des Höhenaufenthalts zugeschrieben werden. Von diesen drei Teilnehmern, welche dasselbe Maß von Muskelarbeit wie die erste Gruppe geleistet hatten, zeigte einer (Waldenburg) eine ausgesprochene Steigerung des Verbrauches, die beiden anderen (Zuntz und Caspari) hatten zum mindesten keine Herabsetzung.

In unseren Versuchen konnten wir keine Veränderung des Ruheumsatzes unter dem Einflusse einer kleineren Periode von Arbeitstagen nachweisen. Wie sich aus der Generaltabelle ergibt, hatte der Hund am ersten Arbeitstage (19. VI.) nach beendeter Steigarbeit einen Ruheumsatz von 63,3 und 65,75 cm³ an verbrauchtem Sauerstoff. Am 30. VI. nach einer Reihe von 10 Arbeitstagen mit nur eintägiger Unterbrechung (24. VI.) betrug der Ruheumsatz entsprechend 60,87 und 62,69 cm³ verbrauchtem Sauerstoff, also Zahlen, welche mit denen vom Beginne der Arbeitsperiode innerhalb der normalen Schwankungen übereinstimmen. Jetzt folgte eine Ruhezeit von 9 Tagen, nach deren Ablauf der Umsatz entsprechend 66,60 cm³ ausmachte. Am 14. VII., nach 4tägiger Arbeit hatten wir Ruhewerte von 62,82 cm³ und 64,74 cm³, am 18. VII. (5. Ruhetag) 66,60 cm³. In der folgenden Zeit wechselt immer ein Ruhetag mit einem Arbeitstag. Am Ende dieser Periode (18. VII. — 31. VII.) hatten wir 59,51 cm³ O. Am Schlusse der folgenden 9 tägigen Ruheperiode hatten wir am 8. VIII. als nie-

drigsten Wert 62,13 cm^3, am 9. VIII. 66,31 cm^3. In der letzten Zeit unserer Versuche wechseln Arbeitstage regelmäßig mit Ruhetagen. Am 13. VIII. betrug der Umsatz entsprechend 61,65 und 58,41 cm^3 Sauerstoff. In der ganzen Zeit unserer Versuche hatte sich das Körpergewicht des Hundes nicht erheblich geändert. In nachfolgender Tabelle sind die Werte nach Arbeits- und nach Ruheperioden einander gegenüber gestellt. Es ergibt sich als Durchschnitt der ersteren 61,53 cm^3, als Durchschnitt der letzteren 65,11 cm^3. Der Umsatz sämtlicher Ruheversuche am nicht ermüdeten Tiere entsprach, wie wir schon angeführt haben, im Mittel 63,60 cm^3 Sauerstoff, am ermüdeten Tiere, nachdem die Nachwirkung der Arbeit vollständig abgeklungen war, 64,28 cm^3 Sauerstoff. Demnach liegt die Differenz zwischen Umsatz am Ende der Ruhe- und Arbeitsperioden noch innerhalb der normalen Schwankungen, doch sprechen die Versuche im Sinne einer geringen Abnahme des Ruheverbrauchs durch die vorangegangene starke Übung der Muskulatur. Zum Vergleiche mit dem oben angeführten Versuche von Zuntz sind unsere Beobachtungen nicht ohne weiteres geeignet, denn unser Versuchshund war vor Beginn unserer Untersuchungen in Freiheit gehalten worden und hatte auch mitunter auf der Tretbahn laufen müssen, während das von Zuntz beobachtete Tier aus einer Periode strengster Ruhe in eine Periode angestrengter Körperabeit kam. Eher wäre schon eine Gegenüberstellung der Versuche von Zuntz und Schumburg zulässig, doch dehnen sich ihre Versuche auf längere Zeit aus als die unserigen. Jedenfalls können wir aus unseren Versuchen schließen, daß kürzere Arbeitsperioden bzw. Ruheperioden den Ruheumsatz nicht wesentlich ändern.

Nach den Ruheperioden Sauerstoffverbrauch in ccm	Nach den Arbeitsperioden Sauerstoffverbrauch in ccm
63,30	60,87
65,75	62,69
66,60	62,82
66,60	64,74
62,13	59,51
	61,65
66,31	58,44
Mittel 65,11	Mittel 61,53

B. Versuche am verdauenden Tiere.

Die vorangegangenen Erörterungen beziehen sich auf Versuche am nüchternen Tiere. Die Verdauung steigert, wie bekannt, den Ruheumsatz bei gemischter Nahrung etwa bis zu 18 — 20 Stunden nach der Nahrungsaufnahme (Magnus-Levy)[16]. Dem entsprechend fanden wir für den Ruhestoffwechsel in der 13.—18. Stunde der Verdauung des nicht ermüdeten Hundes noch eine Erhöhung des Umsatzes des vollkommen nüchternen Versuchstieres (über 20 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme) von:

Sauerstoff pr. Min. in cm^3	Kohlensäure pr. Min. in cm^3	Resp. Quot.	Atemgröße pr. Min. in Lit.	Zahl der Versuche
63,60	45,04	0,70	1,35	25
auf:				
70,44	56,47	0,82	1,68	25

Das ist also um ca. 11% des Sauerstoffverbrauches in nüchternem Zustande. Um nun auch den Einfluß der Ermüdung auf den Stoffwechsel des Tieres während der Verdauung zu ermitteln, fütterten wir den Hund am 28. VII. vor dem Versuche, mit seiner Tagesration. Eine halbe Stunde nach der Fütterung betrug der Sauerstoffverbrauch 94,44 cm^3 pro Min., die Kohlensäureabgabe 66,94 cm^3 (Vgl. die Generaltabelle). Das bedeutet einen Mehrverbrauch an Sauerstoff um etwa 48% des Grundumsatzes. Darauf legte der Hund auf der Tretbahn einen Weg von 4548 m Länge und 1326 m Steigung zurück. Der Ruheumsatz betrug 19 Min. nach der Steigarbeit (in der vierten Verdauungsstunde) 119,9 cm^3 Sauerstoff, 69,55 cm^3 Kohlensäure, 2 Std. 14 Min. nach der Steigarbeit, (in der sechsten Verdauungstunde) 97,13 cm^3 Sauerstoff und 71,08 cm^3 Kohlensäure, 4 Std. 26 Min. nach der Steigarbeit (in der achten Verdauungsstunde) 111,40 cm^3 Sauerstoff und 88,15 cm^3 Kohlensäure.

Aus unseren Zahlen ergibt sich demnach, daß die Ermüdung die normale Steigerung des Ruheumsatzes während der Verdauung jedenfalls nicht herabzudrücken vermag. Dieses Ergebnis ist für die Erklärungsversuche der Umsatzsteigung während der Verdauung von Interesse. Während Zuntz und seine Schule diese Steigerung im wesentlichen auf die Verdauungs- und Resorptions-Arbeit beziehen, haben Fick[18]) u. a. die Ansicht ausgesprochen, daß diese Steigerung von Mehrangebot von oxydierbarem Material herrührt. Rubner[17]) endlich glaubt, daß der Mehrverbrauch durch eine Um-

formung der Nahrungsstoffe im Organismus, durch welche Sauerstoff gebunden wird, bedingt ist. Daß ein Mehrangebot an oxydabeln Stoffen nicht die Ursache der Mehrzersetzung sein kann, ist aus unserem Versuche zu entnehmen. Denn das Mehrangebot müßte durch Mehrverbrauch bei der beträchtlichen Steigarbeit kompensiert worden sein, und es wären nach der Steigarbeit dann normale Ruhewerte zu erwarten gewesen. Wie aber das Versuchsresultat zeigt, war der Verbrauch fast auf das doppelte gesteigert.

II. Einfluß der Ermüdung auf den Arbeitsumsatz.

Anhangsweise teilen wir einige Versuche über den Einfluß der Ermüdung auf den Arbeitsumsatz des Hundes mit. Zu diesem Zweck ließen wir den Hund in gleichmäßigem Tempo auf einer ansteigenden Tretbahn laufen und bestimmten seinen Stoffumsatz zu Beginn und am Ende der Steigarbeit. Die ganze Versuchsanordnung und die Entnahme der Atemprobe während des Laufens war dieselbe, wie sie Zuntz in seiner Arbeit („Über den Stoffverbrauch des Hundes bei Muskelarbeit,“ Pflüger's Arch. Bd. 68 1897) angibt. Da die Arbeit des Tieres im frischen und ermüdeten Zustande annähernd denselben Wert hatte, so geht aus dem Vergleiche der Zahlen zu Beginn und am Schlusse der Arbeit der Einfluß auf den Stoffverbrauch unmittelbar hervor.

Die Geschwindigkeit, mit welcher das Versuchstier seinen Weg zurücklegt, die Steigung dieses Weges, sowie die bei den Versuchen gewonnenen Werte für Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureproduktion sind aus folgender Tabelle leicht zu ersehen (Seite 478 und 479).

Es ergibt sich zunächst in jedem einzelnen Versuche eine beträchtliche Steigerung des Arbeitsumsatzes im Ermüdungszustande. Als Mittel der Versuche am Beginn der Steigarbeit erhalten wir einen Umsatz pro kg Körpergewicht und 1000 m Weg entsprechend 764,3 cm^3 verbrauchten Sauerstoffes = 3622 kalorien, am Ende der Steigarbeit 871,8 cm^3 verbrauchten Sauerstoffes = 4099 kalorien. Die durch die Ermüdung bewirkte Umsatzsteigerung beträgt mithin 13,2 %. Da aber am Ende der Arbeit die Ventilation im Vergleich zum Beginne erhöht war, so entfällt ein Teil dieser Umsatzsteigerung auf erhöhte Atemarbeit. Bringen wir für 1 l Ventilation pro Minute 5 cm^3 Sauerstoff in Anrechnung, so beträgt der Verbrauch am Ende der Arbeit abzüglich

Generaltabelle der Arbeitsversuche.

Versuche zu Beginn der Arbeit.

Datum	Versuchszeit	Arbeitendes Gesamt-Gewicht[1]) kg	In Prozenten der exspir. Luft		Atemgröße pro Minute in Litern	Pro Minute in cm^3		Respir.-Quot.	m Weg pro Min. bei einer Steigung von 29,16 % des Weges	Steigung pro Minute in m	O-Verbrauch pro 1000 m Weg und kg Körpergewicht in cm^3 nach Abzug des Ruheumsatzes	Umgesetzte Energie pro 1000 m Weg und kg Körpergewicht in kalorien[3]) nach Abzug des Ruheums.
			Sauerstoffverbrauch %	Kohlensäureabgabe %		aufgenommener Sauerstoff	abgegebene Kohlensäure					
19. VI.	12^{44-53}	10,5	4,85	3,80	10,10	437,36	342,22	0,78	45,16	13,17	778,1	3717,0
20. VI.	$12^{59}-1^{7}$	10,5	3,93	2,87	13,53	474,90	346,02	0,73	45,55	13,28	849,94	4007,3
22. VI.	1^{14-24}	10,5	4,73	3,44	9,89	418,37	304,84	0,73	45,75	13,34	728,59	3435,1
23. VI.	11^{0-10}	10,5	4,79	3,46	10,01	429,65	310,20	0,72	46,07	13,43	746,60	3510,8
25. VI.	12^{18-26}	10,5	4,03	3,08	11,81	427,00	325,50	0,76	46,14	13,45	740,2	3517,5
(27. VI.	11^{44-51}	10,5	3,88	3,44	14,70	509,73	452,50	0,89 [2])	46,27	13,49	908,4	4462,3)
11. VII.	$10^{56}-11^{5 1/2}$	10,35	2,93	2,32	17,80	465,90	363,72	0,78	50,82	14,82	757,7	3619,3
	Summe[3]):	—	25,26	18,97	73,14	2653,18	1992,50	4,50	279,49	84,10	5509,53	26269,3
	Durchschnitt:	10,5	4,31	3,16	12,19	442,19	332,09	0,75	46,58	14,01	764,8	3622,0

Durchschnitt aus den 5 Versuchen (vom 19., 22., 23., 25. VI. und 11. VII., in welchen zu Beginn und am Ende der Arbeit vergleichbare Zahlen gewonnen wurden:

—	*4,28*	*3,22*	*11,92*	*435,66*	*329,29*	*0,75*	*46,79*	*14,16*	747,55	3548,1

[1]) Das Gewicht des Hundes (10 kg) und des Geschirres samt Atemventilen (ca. 500 g).

[2]) Wegen des außerordentlich hohen respiratorischen Quotienten, der offenbar darauf zurückzuführen ist, daß der Versuch in eine Periode vor Abschluß der Verdauungszeit fällt, wurden die Werte dieses Versuches vom 27. VI. in die Berechnung der Durchschnittswerte nirgends mit einbezogen.

[3]) Berechnet nach dem Vorgange von Zuntz und Schumburg[3]) S. 260.

Versuche am Ende der Arbeit.

Datum	Versuchszeit	Arbeitendes Gesamt-Gewicht kg	In Prozenten d. exspir. Luft: Sauerstoffverbrauch %	Kohlensäureabgabe %	Atemgröße pro Min. in Litern	Pro Minute in cm³: aufgenommener Sauerstoff	abgegebene Kohlensäure	Respir.-Quot.	m Weg pro Min. bei einer Steigung von 29,16 % des Weges	Steigung pro Min. in m	O-Verbrauch pro 1000 m Weg und kg Körpergewicht in cm³ nach Abzug des Ruheumsatzes	Umgesetzte Energie pro 1000 m Weg und kg Körpergewicht in kalorien n. Abzug des Ruheumsatzes	O-Verbrauch pro 1000 m Weg und kg Körpergew. in cm³ nach Abzug des Ruheumsatzes und des Verbrauchs für die Mehrventilation	Umgesetzte Energie pro 1000 m Weg und kg Körpergewicht in kalorien nach Abzug des Ruheumsatzes und des Verbrauchs für die Mehrventilation	Bis zum Beginn des Versuches am Ende der Arbeit zurückgelegter Weg: Weglänge in m	Steigung in m
19. VI.	3¹⁹—²⁴	10,5	2,68	2,05	19,96	473,04	362,52	0,77	45,03	13,13	827,4	4157	765,7	3648	4470	1303
22. VI.	4⁴⁷—⁵³	10,5	3,63	2,64	16,03	517,54	376,00	0,73	47,96	13,98	909,98	4290,3	847,8	3997,2	6200	1808
23. VI.	1⁴⁸—⁵⁵	10,5	3,62	2,61	14,44	466,15	336,10	0,72	46,27	13,49	835,3	3927,8	788,8	3718,9	7440	2170
25. VI.	3⁵²—⁵⁹	10,5	4,18	2,82	13,23	495,32	333,17	0,67	46,27	13,49	896,56	4201,3	881,64	4131,3	8110	2365
27. VI.	3¹⁷—²⁴	10,5	4,46	3,43	14,70	577,55	444,02	0,77	48,22	14,06	1025,9	4888,2	1025,9	4888,2	9290	2709
11. VII.	4⁰³—¹¹	10,35	3,46	2,22	17,80	544,70	348,70	0,64	52,13	15,20	893,34	4186,2	893,34	4186,2	11400	3324
13. VIII.	5²⁸—³⁷	ca. 10,5	5,50	3,76	6,77	335,40	229,57	0,68	35,06	10,22	740,0	3467,7	—	—	9240	2694
21. VIII.	4¹⁴—¹⁸	ca. 10,5	3,77	2,77	14,62	504,60	371,00	0,74	51,48	15,01	823,34	3892,1	—	—	12670	3694
24. VIII.	3⁴⁰⁻⁴⁷½	ca. 10,5	5,10	3,84	8,53	400,00	300,20	0,75	39,53	11,53	815,1	3863,3	—	—	12950	3776
Summe:		—	36,40	26,14	126,08	4314,30	3101,28	6,47	411,95	122,79	7766,92	36872,9	—	—	81770	23843
Durchschnitt:		10,5	4,04	2,90	14,01	479,37	344,58	0,72	45,77	13,64	**871,8**	**4099**	**852,7**	**4010**	9080	2649

Durchschnitt aus den 5 Versuchen (vom 19., 22., 23., 25. VI. und 11. VII., in welchen zu Beginn und am Ende der Arbeit vergleichbare Zahlen gewonnen wurden:

		—	*3,51*	*2,47*	*16,29*	*499,35*	*351,30*	*0,71*	*47,53*	*14,39*	**881,64**	**4184,7**	**836,94**	**3925,1**	—	—

des Betrages für die Mehrventilation 852,7 cm³ Sauerstoff entsprechend 4010 kalorien. Nach dieser Berechnung bleibt am Ende der Arbeit ein Mehrverbrauch von 10,7%. Die umsatzsteigernde Wirkung der Ermüdung wurde schon wiederholt beobachtet, so von A. Löwy[8]), Zuntz u. Schumburg[5]), Leo Zuntz, Löwy, Müller u. Caspari[4]) u. a. Die von uns beobachtete Steigerung des Umsatzes um 10% steht mit den diesbezüglichen Ergebnissen von Zuntz u. Schumburg beim Menschen in auffallender Übereinstimmung.

Als Ursache für die umsatzsteigernde Wirkung der Ermüdung spricht A. Löwy unzweckmäßige und unökonomische Arbeit an, die im Ermüdungszustande bis dahin geschonten für die vorliegende Art der Arbeit nicht geübten Muskeln übertragen wird. Am Hunde hat Zuntz[20]) einige Versuche angestellt, die mit den unsrigen vergleichbar sind. Zuntz bezieht den erhöhten Stoffumsatz teilweise auf erhöhte Körpertemperatur während der Arbeitsleistung. In unsern Versuchen ist die Mitwirkung eines derartigen Einflusses sehr wahrscheinlich, denn die Ventilation, welche beim Hunde an der Wärmeregulation beteiligt ist, war in den Versuchen am ermüdeten Tiere meist größer als am frischen Tiere, was durch Gegenüberstellung der Prozentzahlen an verbrauchtem Sauerstoff und abgegebener Kohlensäure in der Respirationsluft zum Vorschein kommt. Im Mittel waren in den Versuchen am frischen Tiere 4,28 % Sauerstoff der Respirationsluft verbraucht und 3,22 % Kohlensäure abgegeben worden, in den Versuchen am ermüdeten Tiere 3,51 % und 2,47 %. Weiter scheint sich aus unseren Versuchen ein Einfluß des Trainings im Sinne der ökonomischeren Arbeit zu ergeben. In den ersten zwei Versuchen (19. VI. und 20. VI.), die in den Beginn der Laufversuche fallen, ist für dieselbe Arbeitsleistung der Stoffverbrauch im Vergleiche zu den späteren Versuchen deutlich vermehrt.

Zusammenfassung.

1. In der Ruhe nach ermüdender Körperarbeit ist der Umsatz zu keinem Zeitpunkte geringer als im nicht ermüdeten Zustande.

2. Vielmehr ist der Stoffwechsel die erste Zeit nach der Arbeit erhöht, um nach kürzerer oder längerer Zeit auf die Norm abzusinken.

3. Der respiratorische Quotient ist während der ersten Zeit nach der Arbeit meist abnorm niedrig, es wird ein Teil der gebildeten Kohlensäure zurückgehalten, weil das Blut vorher durch eine Anzahl von Einflüssen an Kohlensäure verarmt war (Säuerung des Blutes, vermehrte Ventilation infolge Überwärmung während und unmittelbar nach der Arbeit), vielleicht auch, weil infolge von oberflächlicher flacher Atmung (Wärmetachypnoë) die Ventilation und damit die Bedingung für die CO_2-Abgabe im Vergleich zur vorangehenden Laufperiode ungünstig ist.

4. Mehrtägige Arbeits- oder Ruheperioden bewirken keine erheblichen Veränderungen des Ruheumsatzes.

5. Körperanstrengung und Ermüdung haben keinen wahrnehmbaren Einfluß auf die umsatzsteigernde Wirkung der Verdauung.

6. Im Ermüdungszustande ist für dieselbe Arbeitsleistung ein größerer Energieaufwand notwendig als im ausgeruhten Zustande.

Zum Schlusse erlauben wir uns Herrn Geh.-Rat. Prof. Zuntz für die Anregung zu dieser Arbeit und für das wohlwollende Interesse, das er ihr entgegengebracht hat, den Herren des Institutes, besonders Herrn Assist. Hans Püchtner, für ihre Unterstützung herzlich zu danken.

Literatur.

[1]) Pettenkofer u. Voit, Untersuchungen über den Stoffverbrauch des normalen Menschen. Ztschr. f. Biolog. 2, 459. 1866.

[2]) Zuntz u. Hagemann, Untersuchungen über den Stoffwechsel des Pferdes. Neue Folge, Landw. Jahrb. 27. Ergänz. 3. 1898.

[3]) Zuntz u. Schumburg, Physiologie des Marsches, Berlin 1901. (Bibl. v. Coler. 6).

[4]) Zuntz, Loewy, Müller und Caspari, Höhenklima und Bergwanderungen usw. Berlin, Bong & Co. 1906.

[5]) Zuntz, Über den Stoffverbrauch des Hundes bei Muskelarbeit. Pflügers Arch. 68, 191. 1897, und Slowtzoff, Über die Beziehungen zwischen Körpergröße und Stoffverbrauch der Hunde bei Ruhe und Arbeit. Pflügers Arch. 95. 1903.

[6]) Speck, Über den Einfluß der Muskeltätigkeit auf den Atemprozeß. Deutsches Arch. f. klin. Med. 45. 1889.

[7]) Katzenstein, Über die Einwirkung der Muskeltätigkeit auf den Stoffverbrauch des Menschen. Pflügers Arch. 49, 330. 1891.

[8]) A. Loewy, Die Wirkung ermüdender Muskelarbeit auf den respirator. Stoffwechsel. Pflügers Arch. 49, 405. 1891.

[9]) Lehmann, Müller, Munk, Senator, Zuntz, Untersuchung an zwei hungernden Menschen. Virchows Arch. 131, Suppl. 1893.

[10]) Zuntz und Lehmann, Untersuchungen über den Stoffwechsel beim Pferde. Landw. Jahrb. 18. 1889.

[11]) Zuntz und Geppert, Über die Regulation der Atmung. Pflügers Arch. 42, 189. 1888.

[12]) Bornstein und v. Gartzen, Über den respirator. Stoffwechsel bei statischer Arbeit. 3. Mitteilung, Über den Einfluß der Atemarbeit usw. Pflügers Arch. 109, 628. 1905.

[13]) Magnus-Levy, Respirationsversuche am diabetischen Menschen. Ztschr. f. klin. Med. 56. 1905. Festschr. f. Naunyn, 2. Teil, S. 83.

[14]) Cohnstein, Über die Änderung des Blutalkaleszenz durch Muskelarbeit. Virchows Arch. 130, 332. 1892.

[15]) Mosso, Der Mensch auf den Hochalpen. Leipzig 1899.

[16]) Magnus-Levy, Über die Größe des respirator. Gaswechsels unter dem Einflusse der Nahrungsaufnahme. Pflügers Arch. 55, 1. 1893.

[17]) Rubner, Die Vertretungswerte der hauptsächlichsten organ. Nahrungsstoffe im Tierkörper. Ztschr. f. Biol. 19, 313. 1883 und Gesetze des Energieverbrauches bei der Ernährung. Deuticke. 1902.

[18]) Fick, Die Zersetzung des Nahrungseiweißes im Tierkörper. Sitz.-Ber. d. physik.-med. Ges. zu Würzburg 1890, Nr. 1.

[19]) A. Loewy, Untersuchung über Respiration und Zirkulation. Berlin 1895. und Über die Bestimmung der Größe des „schädlichen Luftraumes", im Thorax und der alveolaren Sauerstoffspannung. Pflügers Arch. 58, 416. 1894.

[20]) N. Zuntz, Einfluß der Geschwindigkeit der Körpertemperatur und der Übung auf den Stoffverbrauch bei Ruhe und Muskelarbeit. Pflügers Arch. 95, 192. 1903.

[21]) Mosso, Periodische Atmung und Luxusatmung. Arch. f. (Anat. und) Physiol. 1886, Suppl. S. 37.

Über den Einfluß des Sauerstoffes bei der Schädigung der Fermente (Invertin) durch Wärme.

Von

A. Jodlbauer.

(Aus dem pharmakologischen Institut München.)

(Eingegangen am 1. Februar 1907.)

Die Frage nach der Wirkung des Lichtes auf Fermente hat von den verschiedenen Forschern verschiedene Beantwortung erfahren. Einige, Downes und Blunt 1879[1]), Fermi und Pernossi 1894[2]), wiesen eine Schädigung durch Licht nach, andere, Emmerling 1901[3]), Weiß 1901[4]), fanden keine solche. Die Belichtung geschah stets unter Glas in der Sonne. Schmidt-Nielßen 1905[5]), der Chymosin als Versuchsobjekte wählte, verwendete im Gegensatz zu den Versuchen der vorher angeführten Autoren statt der Glasgefäße Quarzcuvetten mit planparallelen Wandungen. Hierdurch wird das Eindringen der ultravioletten Strahlen ermöglicht, die durch Glas bekanntlich nicht hindurchgehen. Er fand, daß es eben die ultravioletten Strahlen sind, die Fermente (Chymosin) zer-

---

[1]) A. Downes und T. P. Blunt, On the Influence of light upon protoplasm. Proceedings of the Royal Society. **28**, 205.

[2]) Fermi und Pernossi, Über die Enzyme. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. **18**, 86.

[3]) O. Emmerling, Die Einwirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme. Berichte der Deutsch. chem. Ges. **34**, 3811.

[4]) Weiß, Studier over proteolytiske Enzymer i spirende byg (Malt.). Meddelelser fra Carlsberg laboratoriet **5**. Bind 3de Hefte pag. 239 zitiert nach Schmidt-Nielßen.

[5]) Schmidt-Nielßen, Die Wirkungen des konzentrierten elektrischen Bogenlichtes auf Chymosin, Chymosinogen und Antichymosin. Mitteilungen aus Finsens med. Lysinstitut IX. Heft pag. 199.

stören, während der andere Teil des Spektrums allein ohne Einfluß ist. Dann schaltete er seinen Cuvetten Glas vor, so blieb die Lichtwirkung aus. Allerdings war nach mehrstündiger Belichtung mit durch Glas filtrierten Lichstrahlen die zur Koagulation der Milch nötige Zeit (normal 3 Minuten) um $^1/_8$ — $^1/_4$ Minuten verlängert. Doch führt Schmidt-Nielßen dies auf Versuchsfehler zurück und schließt sich betreff der sichtbaren Strahlen Emmerlings Ansicht an.

Hierdurch sind aber die vorerwähnten Widersprüche keineswegs gehoben, da sämtliche früheren Forscher Glasgefäße verwendet haben. Über die Wirkung der sichtbaren Strahlen aber eindeutige Ergebnisse zu erhalten, war für die Erkenntnis der photodynamischen Wirkung fluoreszierender Stoffe unbedingt nötig. Denn nur dadurch war ein Entscheid möglich, ob die Wirkung des Lichtes allein und die des Lichtes + fluoreszierender Substanz wesensgleich sind. Für letztere stand fest, daß sie sich nur bei Sauerstoffgegenwart vollzieht. Sind Lichtwirkung und photodynamische Wirkung qualitativ gleiche Vorgänge, so müssen die sichtbaren Strahlen wirksam sein und ferner muß die Wirkung von der Sauerstoffanwesenheit abhängen.

Die Untersuchungen von Tappeiners und mir [1]) [2]) haben nun einwandfrei die Wirksamkeit der sichtbaren Strahlen auf Invertin ergeben, falls Sauerstoff zugegen ist. Ist er aber ersetzt durch andere Gase z. B. Wasserstoff, dann fehlt die Lichtwirkung. Im Gegensatz hierzu steht die Wirkung der Glas nicht passierenden ultravioletten Strahlen. Diese vermögen auch bei Sauerstoffabwesenheit Invertin zu schädigen resp. zu zerstören. Es wird sich also im ersteren Falle um eine einfache Oxydation, im letzteren um eine tiefgreifendere Veränderung im Molekül handeln. Was die Oxydation durch die sichtbaren Strahlen anlangt, so haben unsere Versuche die Ergebnisse der Forscher, die sich zuerst mit diesem Gegenstand beschäftigten, bestätigt. Downes und Blunt fanden schon, daß, falls man die Belichtungsgefäße evakuierte, die Lichtwirkung ausbleibt.

---

[1]) A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung des Lichtes auf Enzyme in Sauerstoff und Wasserstoffatmosphäre. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **85**, 386.

[2]) A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Enzyme. Deutsch. Arch. für klin. Med. **87**, 373.

Ihre Beobachtung scheint aber in Vergessenheit geraten zu sein. Obwohl in verschiedenen Arbeiten (z. B. bei Schmidt-Nielßen) zitiert, ist darauf kein weiterer Wert gelegt worden. Auch uns wurde sie erst nach Fertigstellung unserer Versuche bekannt. Durch die Notwendigkeit der Sauerstoffanwesenheit lassen sich auch die Gegensätze der Versuchsergebnisse der verschiedenen Forscher erklären. Emmerling, der bei seinen Versuchen vollgegefüllte Glasgefäße benutzte, kam deshalb zu negativem Ergebnis, da nicht genügend Sauerstoff zugegen war, die Lichtwirkung auszulösen. Es wird auch eine Rolle spielen, wie die Fermentlösungen bereitet wurden: ob mit frisch ausgekochtem sauerstoffarmem Wasser oder mit gestandenem, ferner ob durch Umschütteln der Lösungen eine reichliche Gasabsorption ermöglicht war usw.

Nachdem somit die Bedeutung des Sauerstoffs für die Wirkung der sichtbaren Strahlen feststand, lag die Frage nahe, ob bei der Schädigung der Fermente durch Wärme die Anwesenheit des Sauerstoffes ebenfalls eine Rolle spielt.

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie in früheren im deutschen Archiv für klinische Medizin Bd. 85 S. 388 beschriebenen Versuchen: 1 g Invertin — von E. Merck bezogen — wurde mit 100 ccm Wasser ausgezogen, dann durch Zentrifugieren eine klare Lösung hergestellt. Je 20 ccm kamen in gläserne Gefäße von Zylinderform die nach dem Prinzip der Waschflaschen eine zu- und abführende Röhre hatten, wobei die zuführende Röhre bis nahe an den Boden reichte, um die Lösungen möglichst von fremden Gasen frei waschen zu können. Der Rauminhalt war ca. 100 ccm. Die mit der Fermentlösung beschickten Röhren wurden evakuiert und dann Sauerstoff resp. Wasserstoff durchgeleitet. Evakuieren und Durchleiten wurde stets drei mal wiederholt. Sauerstoff wie Wasserstoff waren elektrolytisch dargestellt.

In einer Versuchsreihe war die Temperatur im Thermostat 35° C, in einer zweiten 45° C, in einer dritten 55° C. Hervorheben muß ich, daß bei den Zeitangaben, wie lange die Fermentlösungen im Thermostat blieben, die Zeit, welche nötig ist, die Lösungen von der Zimmertemperatur auf die im Wärmeschrank zu bringen, miteingerechnet ist.

Nach bestimmter Zeit wurden die Invertinlösungen aus dem Wärmekasten genommen und je 5 ccm mit 15 ccm 15%iger Rohrzuckerlösung versetzt und nach 14 Stunden der Invertierungsgrad

mittels eines Halbschattenapparates nach Laurant bestimmt. Bekanntlich spaltet ja das Invertin den die Polarisationsebene rechts drehenden Rohrzucker in die rechtsdrehende d-Glukose und in die linksdrehende d-Fruktose. Da letztere stärker links dreht als die erstere nach rechts, geht die ursprüngliche Rechtsdrehung mit der fortschreitenden Fermentierung stetig zurück und wird schließlich zur Linksdrehung. Man kann deshalb aus der Abnahme der R-Drehung leicht die Größe der Fermentwirkung bestimmen. Zieht man die abgelesene Drehung von der ursprünglichen ab und dividiert die Differenz durch 0,879[1]), so erhält man die Menge des gebildeten Invertzuckers in g. Die anfängliche Drehung nach dem Mischen der Fermentlösung mit dem Zucker war + 7,48°/₀.

Tabelle I.

Temperatur im Wärmeschrank 35° C. Die mit Wasserstoff und mit Sauerstoff gefüllten Flaschen bleiben 18 Stunden darin stehen. Nach dieser Zeit zeigen die Lösungen eine Spur von Trübung. Die Vermengung der Fermentlösung mit Rohrzucker geschah nach den oben gemachten Angaben. Nach 14 Stunden Invertierung ist die

	Drehung	Gebildeter Invertzucker	Invertierung in °/₀, Kontrollversuch = 100 gesetzt	Schädigung in °/₀, Kontrollversuch = 100 gesetzt
Wasserstoffflasche . .	+ 0° 04′	8,44 g	90,2	9,8
Sauerstoffflasche	+ 0° 05′	8,42 „	90,0	10,0
In der Kälte gehaltene Kontrollösung	— 0° 45′	9,36 „	100	0

Tabelle II.

Temperatur im Wärmeschrank 45° C. Die Lösungen verbleiben 4 Stunden in demselben.

	Drehung	Gebildeter Invertzucker	Invertierung	Schädigung
Wasserstoffflasche . .	+ 0° 54′	7,49	81,7	18,3
Sauerstoffflasche	+ 0° 53′	7,51	81,9	18,1
In der Kälte gehaltene Kontrollprobe	— 0° 35′	9,17	100	0

[1]) Da α_D der Saccharose = + 66,5°, α_D des Invertzuckers bei 20° C. = — 21,4° ist, beträgt die Verschiebung der Drehung bei vollständiger Invertierung 87,9°.

Tabelle III.

Temperatur wie bei II. Die Lösungen bleiben 8 Stunden im Wärmeschrank.

	Drehung	Gebildeter Invertzucker	Invertierung in ‰ Kontrollversuch = 100 gesetzt	Schädigung in ‰ Kontrollversuch = 100 gesetzt
Wasserstoffflasche . .	+ 2° 08′	6,09	55,5	44,5
Sauerstoffflasche	+ 2° 11′	6,03	54,9	45,1
In der Kälte gehaltene Kontrollprobe	— 0° 30′	9,17	100	0

Tabelle IV.

Temperatur im Wärmeschrank 55° C. Die Lösungen verbleiben 2 Stunden in demselben.

	Drehung	Gebildeter Invertzucker	Invertierung in ‰ Kontrollversuch = 100 gesetzt	Schädigung in ‰ Kontrollversuch = 100 gesetzt
Wasserstoffflasche , .	+ 2° 22′	5,81	62,1	37,9
Sauerstoffflasche	+ 2° 18′	5,89	62,9	37,1
In der Kälte gehaltene Kontrollprobe	— 0° 45′	9,36	100	0

Tabelle V.

Temperatur wie in Tabelle IV. Die Lösungen verbleiben 4 Stunden im Wärmeschrank.

	Drehung	Gebildeter Invertzucker	Invertierung in ‰ Kontrollversuch = 100 gesetzt	Schädigung in ‰ Kontrollversuch = 100 gesetzt
Wasserstoffflasche . .	+ 6° 08′	1,54	16,5	83,5
Sauerstoffflasche	+ 6° 08′	1,54	16,5	83,5
In der Kälte gehaltene Kontrollprobe	— 0° 45′	9,36	100	0

Aus diesen Tabellen ersieht man, daß die Schädigung des Invertins gleich groß ist, ob Sauerstoff oder Wasserstoff zugegen ist. Es kann sich also hierbei nicht um einen einfachen Oxydationsvorgang handeln wie bei der Wirkung der sichtbaren Strahlen. Es besteht somit ein scharfer Gegensatz zwischen der Schädigung der Fermente durch die sichtbaren Lichtstrahlen und der Wärmeschädigung. Erstere findet nur bei Anwesenheit von Sauerstoff statt, letztere verläuft unbeeinflußt, ob Sauerstoff anwesend ist oder nicht.

Aus den Versuchen geht ferner hervor, daß Photolabilität und Thermolabilität nicht wesensgleich sind, wenngleich die Photolabilität in vielen, wenn nicht den meisten Fällen mit Temperaturerhöhung eine Steigerung erfährt. Die chemischen Vorgänge, die sich bei der Schädigung durch Licht und bei der durch Wärme abspielen, müssen nach obigem voneinander verschieden sein.

Über die Lichtwirkung auf Invertin bei Anwesenheit und Abwesenheit von Rohrzucker und anderen Stoffen.

Von

A. Jodlbauer.

(Aus dem pharmakologischen Institut München.)

(Eingegangen am 2. Februar 1907.)

Bei den Untersuchungen über die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Invertin[1]), worüber ich gemeinsam mit H. v. Tappeiner vor einiger Zeit berichtet habe, waren zwei Versuchsanordnungen gewählt. Bei Anordnung I wurde 0,05 g Invertin (Präparat von E. Merck) in 10 ccm Wasser aufgeschwemmt, 90 ccm 5 %iger Rohrzuckerlösung zugegeben und das Ganze im Erlenmeyerschen Kolben dem zerstreuten Tageslichte ausgesetzt mit oder ohne Zusatz photodynamischer Substanzen. Nach einer bestimmten Zeit stellten wir die Invertierung mittels eines Halbschattenapparates nach Laurent fest. Bei Anordnung II wurde 0,1 % Aufschwemmung von Invertin allein mit oder ohne photodynamische Substanzen dem Lichte ausgesetzt und erst nach der Belichtung 10 % Zuckerlösung ana zugesetzt und nun der Reaktionsverlauf im Dunklen bestimmt. Bei beiden Versuchsanordnungen fanden natürlich Kontrollversuche ohne Belichtung statt. Es fiel nun auf, daß der Einfluß der photodynamischen Substanzen auf Invertin bei der Versuchsanordnung I regelmäßig geringer war, als bei der Anordnung II. Wir schlossen daraus, daß das in Wasser aufgeschwemmte Enzym ohne Zuckerzusatz („ru-

---

[1]) Über die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Protozoen u. Enzyme. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **80**, 427.

hendes Enzym") viel leichter einer Schädigung durch Licht zugängig sei, wie das mit Zuckerlösung versetzte „tätige". O. Gros hat nun in einem Referate in der Zeitschrift für physikalische Chemie Bd. 50 Seite 127 den Schluß, den wir aus unseren Versuchen zogen, deshalb als nicht einwandfrei bezeichnet, weil die Enzymkonzentration bei Anordnung II bedeutend höher ist, als bei Anordnung I.

Ich habe deshalb die Versuche in einer anderen, wie ich glaube, einwandfreien Anordnung nochmals aufgenommen.

In einen Erlenmeyerkolben (I) kamen 10 ccm Fermentlösung — dadurch hergestellt, daß 1 g Invertin (E. Merck) mit 100 ccm Wasser ausgezogen und die Lösung durch Zentrifugieren geklärt wurde — gemengt mit 20 ccm Wasser. In einen II. Kolben kam 10 ccm Ferment und 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung. Beiden Kolben wurde sodann $^1/_{10000}$ mol. Eosin = 0,001 g zugesetzt und zerstreutes Tageslicht 1 bis 1 $^1/_2$ Stunden einwirken gelassen. Da in Kolben II während der Belichtung die Invertierung bereits im Gange war, mußte nach der Belichtungszeit mit dem Polarisationsapparat die Drehung bestimmt und die Menge des gebildeten Invertzuckers sowie des noch nicht invertierten Rohrzuckers berechnet werden. Dieses ist sehr einfach. Bei der vollständigen Invertierung von 1 g Rohrzucker verschiebt sich die Drehung, in einem 1 Dezimeter-Rohr beobachtet, von rechts nach links um 0,879°. Wird somit die nach der Invertierung abgelesene Drehung von der ursprünglichen abgezogen und die Differenz durch den bekannten Faktor 0,879 dividiert, so haben wir den Invertzuckergehalt in Gramm. Nach dieser Berechnung wird dem Kolben I die berechnete Menge Invertzucker sowie Rohrzucker in 20%iger Lösung zugesetzt, während Kolben II mit einem gleichen Volumen Wasser beschickt wird. Um während der Ablesung und Berechnung die Invertierung möglichst auszuhalten, kamen beide Kolben ins Eis. Ist Ablesung, Berechnung und Zugabe richtig und rasch erfolgt, dann muß in Kolben I und II die Drehung die gleiche sein. Ist keine Schädigung des Ferments durch Licht vorhanden, dann verläuft, wie Kontrollversuche, von denen einer in Tabelle I veröffentlicht ist, zeigen, die Invertierung in den beiden Kolben in gleicher Weise weiter.

Tabelle I.

Kolben I enthält 10 ccm Fermentlösung + 20 ccm Wasser. Kolben II 10 ccm Fermentlösung + 20 ccm 20 % ige Rohrzuckerlösung, Drehung + 8,77°. Beide Kolben stehen fünf Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur, darnach werden sie sehr rasch auf Eis gekühlt. Die Drehung in Kolben II ist + 3,5°. Daraus berechnet sich der Gehalt von Invertzucker = 6 g in 100 Lösung. Da nach der Gleichung $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2\ C_6H_{12}O_6$ aus 1 g Rohrzucker 1,0526 g Invertzucker sich bildet, sind durch die Bildung von 6 g Invertzucker 5,7 g Rohrzucker invertiert. Somit ist die Menge des noch nicht invertierten Rohrzuckers 7,63 g in 100 Lösung. Es wird nun zu 20 ccm aus Kolben I 6 ccm 20 % ige Invertzuckerlösung und 7,6 ccm 20 % ige Rohrzuckerlösung, zu Kolben II die gleiche Menge Wasser, somit 13,6 ccm zugesetzt.

Darnach war Drehung in Kolben I + 2° 13′, in Kolben II + 2° 10′. Nach drei Stunden Invertierung + 0° 50′ resp. + 0° 48′; nach sieben Stunden — 0° 17′ resp. — 0° 18′.

Nachdem somit die Versuchsanordnung als richtig sich ergeben hatte, wurde mit den einzelnen Versuchen begonnen.

Tabelle II.

Kolben I enthält 10 ccm Fermentlösung + 20 ccm Wasser + 0,001 g Eosin ($^1/_{10000}$ molekular im Gemenge). Drehung: 0. Kolben II: 10 ccm Fermentlösung + 20 ccm 20 %ige Rohrzuckerlösung + 0,001 g Eosin. Drehung + 8,77°. Beide Kolben stehen drei Stunden im zerstreuten Tageslicht, trüber Tag, hinter hellem Fenster gegen Norden. Nach dieser Zeit ist Drehung in Kolben II + 5° 40′ (= 5,66°). Menge des Invertzuckers (auf 100 ccm Lösung berechnet) 3,538 g. Somit sind 3,361 g Rohrzucker invertiert. Rest des nicht invertierten Rohrzuckers also 9,972 g. Nun wurde zu 20 ccm aus Kolben I 3,55 ccm 20 % ige Invertzuckerlösung und 9,95 ccm 20 % ige Rohrzuckerlösung zugesetzt, zu Kolben II 13,5 ccm Wasser.

Drehung darnach bei Kolben I + 3° 26′, bei Kolben II + 3° 25′. Nach sieben Uhr Invertierung ist Drehung in

Kolben I + 1° 00′,
„ II — 0° 30′.

Der Versuch wurde mehrmals wiederholt und verlief stets in gleichem Sinne.

Von dieser, doch ziemlich komplizierten Versuchsanordnung kann man Abstand nehmen, wenn statt des zerstreuten Tageslichtes starkes Licht (Sonne) verwendet wird und außerdem durch starke Kühlung der Invertierungsprozeß möglichst gehemmt wird. Hierzu sind Belichtungen im Winter sehr geeignet. Bei durch Eosin sensibilisierten Lösungen genügt Sonnenbelichtung während 10 Minuten, um sehr starke Schädigung des Ferments hervorzu-

rufen. Während dieser Zeit war die Invertierung kaum nachweisbar fortgeschritten. Später verzeichnete Versuche sind in dieser Weise angestellt.

Es steht somit fest, daß unsere frühere Beobachtung, wonach durch Zusatz von Rohrzucker zu Invertin die schädigende Wirkung des Lichtes auf dieses Ferment gehemmt wird, richtig war. Selbst kleine Mengen von Rohrzucker genügen hierzu, wie aus folgender Tabelle zu ersehen ist. Allerdings nimmt die Größe der Hemmung mit der Konzentrationsverminderung ab.

Tabelle IIb.

Versuchsanordnung: Je 10 ccm 30%-, 10%-, 3%- und 1% ige Rohrzuckerlösungen resp. je 10 ccm Wasser werden mit 5 ccm 0,1% ige Invertinlösung versetzt, mit 0,001 g Eosin sensibilisiert und teils im Dunkeln stehen gelassen, teils belichtet. Belichtungsdauer war zwölf Minuten in Wintersonne (Temperatur — 2° C.). Nach der Belichtung wurden die Fermentzuckerlösungen mit 10 ccm Wasser, die Fermentwasserlösungen mit 10 ccm Wasser + Zucker versetzt. Und zwar wurde, um beim Invertierungsprozeß in allen Versuchen gleiche Mengen von Zucker zu haben, dem Versuche mit 30% Zucker nur Wasser, dem mit 10% Zucker Wasser + 2 g Zucker, dem mit 3% Zucker Wasser + 2,7 g, dem mit 1% Zucker Wasser + 2,9 g zugegeben. Nach 20 Stunden Stehen bei Zimmertemperatur im Dunkeln wurde die Drehung abgelesen. Anfängliche Drehung + 8° 00′.

	Drehung	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
30% Rohrzucker + Invertin belichtet + sec. Wasser	+0° 35′	94,8	+ 28,8
Wasser + „ „ + „ Zucker	+2° 50′	66,0	
30% Rohrzucker + „ dunkel + „ Wasser	+0° 10′	100	
10% Rohrzucker + „ belichtet + „ „	+0° 50′	91,6	+ 25,7
Wasser + „ „ + „ Zucker	+2° 51′	65,9	
10% Rohrzucker + „ dunkel + „ Wasser	+0° 10′	100	
3% Rohrzucker + „ belichtet + „ Wasser	+1° 00′	89,4	+ 24,9
Wasser + „ „ + „ Zucker	+2° 57′	64,5	
3% Rohrzucker + „ dunkel + „ Wasser	+0° 10′	100	
1% Rohrzucker + „ belichtet + „ Wasser	+2° 10′	74,4	+ 8,9
Wasser + „ „ + „ Zucker	+2° 58′	65,5	
1% Rohrzucker + „ dunkel + „ Wasser	+0° 10′	100	

Ob aber der aus unserer Beobachtung gezogene Schluß Berechtigung hat, daß das „tätige" Ferment weniger angreifbar ist, als das „ruhende", ist eine weitere Frage. Wäre er richtig, so dürfte kein anderer Stoff als Rohrzucker diese Hemmung hervorbringen [1]).

Versuche mit Neutralsalzen (ClNa und SO_4Na_2), Harnstoff, Glyzerin, Glykokoll und Mannit.

Dies zu entscheiden, wurden den zu belichtenden Fermentlösungen statt des Rohrzuckers andere Stoffe in Lösung zugesetzt und zwar in erster Linie 3,42 % Kochsalz, 18,83 % Glaubersalz (SO_4Na_2 + 10 aq.), 3,5 % Harnstoff und 5,4 % Glyzerin. Diese Konzentrationen sind einer 20 %igen Rohrzuckerlösung äquimolekular.

Die Versuchsanordnung war für sämtliche folgende Versuche die gleiche. Je 5 ccm 1 %iger Invertinlösung, durch Zentrifugieren vollständig geklärt, wurden teils mit 10 ccm der zu untersuchenden Lösungen, teils mit 10 ccm Wasser versetzt, mit 0,001 g Eosin sensibilisiert und in dünnwandigen weiten Reagensgläsern auf einer durch einen Elektromotor getriebenen Scheibe im Tageslicht (meist Sonne bei Temperatur unter oder um 0° C.) eine bestimmte Zeit lang belichtet, danach kamen zu den ersteren je 10 ccm Wasser + 3 g Rohrzucker (darin gelöst), zu den letzteren je 10 ccm der zu untersuchenden Lösung + 3 g Rohrzucker. Der Invertierungsprozeß verlief bei Zimmertemperatur im Dunkeln. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Drehung abgelesen und die Invertierung berechnet, wobei die Invertierungsgröße der nicht belichteten Kontrollösung = 100 gesetzt wurde. Die anfängliche Drehung war 7° 30′.

---

[1]) Versuche in dieser Richtung sind mir bisher nicht bekannt. Wohl hat Fermi und Pernossi einige Angaben über die Wirkung des Sonnenlichtes auf das Trypsin und das Pepsin in Gegenwart verschiedener Säuren und einiger Salze gemacht, jedoch sind dieselben zu exakten Schlüssen nicht heranzuziehen, da die schädigende Wirkung der Wärme während der Belichtung nicht ausgeschaltet ist. So beträgt in der einen Versuchsreihe die höchste Temperatur am schwarzen Aktino-Thermometer 54 bis 56° C., in der anderen 47° C. Es kann somit die Gegenwart der Säuren und Salze ebensowohl auf die schädigende Wirkung der Wärme, als auf die des Lichtes bezogen werden.

Tabelle III.

10 Minuten Belichtung (Sonne). Drehung wurde nach sieben Stunden Invertierung bei Zimmertemperatur abgelesen.

	Drehung	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
3,42 % ClNa-Lösung + Invert. belichtet + sec. Wasser	$+6^\circ 25'$	29,4	+ 0,2
Wasser + „ „ + „ ClNa	$+6^\circ 26'$	29,2	
3,42 % ClNa-Lösung + „ dunkel + „ Wasser	$+3^\circ 50'$	100	
18,83 % SO_4Na_2-Lös. + „ belichtet + „ Wasser	$+6^\circ 35'$	27,6	0
Wasser + „ „ + „ SO_4Na_2	$+6^\circ 35'$	27,6	
18,83 % SO_4Na_2-Lös. + „ dunkel + „ Wasser	$+4^\circ 40'$	100	
Wasser + „ belichtet + „ Wasser	$+6^\circ 25'$	21,9	
„ + „ dunkel + „ „	$+2^\circ 35'$	100	

Da die Invertierung nach 7 Stunden noch so wenig fortgeschritten, kam derselbe Versuch nach weiteren 14 Stunden nochmals zur Ablesung.

	Drehung	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
3,42 % ClNa-Lös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	$+4^\circ 40'$	33,4	
Wasser + „ „ + „ ClNa	$+4^\circ 38'$	33,8	— 0,4
Kochsalzlös. + „ dunkel + „ Wasser	$-1^\circ 00'$	100	
18,83 % SO_4Na_2-Lös. + „ belichtet + „ Wasser	$+4^\circ 55'$	30,6	0
Wasser + „ „ + „ SO_4Na_2	$+4^\circ 55'$	30,6	
SO_4Na_2 + „ dunkel + „ Wasser	$-0^\circ 55'$	100	
Wasser + „ belichtet + „ Wasser	$+4^\circ 55'$	28,7	
„ + „ dunkel + „ „	$-1^\circ 30'$	100	

45 Minuten Belichtung (trübes Wetter) Drehung nach 7 Uhr abgelesen.

	Drehung	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
3,5 % Harnstofflös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	$+4^\circ 14'$	60,0	
Wasser + „ „ + „ Harnstoff	$+4^\circ 13'$	60,2	— 0,2
3,5 % Harnstofflös. + „ dunkel + „ Wasser	$+2^\circ 09'$	100	
5,4 % Glyzerin + „ belichtet + „ Wasser	$+4^\circ 33'$	66,1	0
Wasser + „ „ + „ Glyzerin	$+4^\circ 33'$	66,1	
5,4 % Glyzerin + „ dunkel + „ Wasser	$+3^\circ 01'$	100	
Wasser + „ belichtet + „ Wasser	$+4^\circ 00'$	57,6	
Wasser + „ dunkel + „ „	$+1^\circ 25'$	100	

Es zeigte sich also, daß die der 20%igen Rohrzuckerlösung äquimolekularen Kochsalz-, Glaubersalz-, Harnstoff- und Glyzerinlösungen sich nicht so verhalten, wie Rohrzucker und keine Hemmung der Lichtschädigung bewirken.

Auffallend ist die stark verzögernde Wirkung all dieser Zusätze auch in den dunkel gehaltenen Kontrollversuchen. Sie ist für die Neutralsalze längst bekannt[1]); H. Braeuning[2]) hat in seiner Arbeit über die Geschwindigkeit der Fermentreaktion bei Zusatz chemisch indifferenter Körper sie für Glyzerin, Harnstoff und Traubenzucker nachgewiesen. Braeuning kommt zu dem Schluß, daß eine Fermentreaktion um so langsamer vor sich geht, je mehr das Wasser des Mediums durch einen chemisch indifferenten in Wasser löslichen Stoff ersetzt wird.

Da aber die verwendeten Lösungen prozentual der Rohrzuckerlösung weit zurückstehen, wurden auch noch konzentriertere Lösungen verwendet und zwar 29% Kochsalz, 42,5% Glaubersalz, 21,5% Harnstoff (6fache Menge der vorher verwendeten Konzentration) 21,6% Glyzerin (5fache Menge der vorher verwendeten Konzentration). Die Kochsalz- resp. Glaubersalzkonzentration wurde deshalb so gewählt, weil diese beiden Konzentrationen gleiche relative Reibung besitzen, gleich einer 17,5%igen Rohrzuckerlösung. Würden diese hohen Konzentrationen ähnlich dem Rohrzucker wirken, so könnte ein Entscheid getroffen werden, welche Rolle bei dieser Hemmung der Lichtwirkung die Viskosität spielt. Diese innere Reibung wurde mittels eines Apparates bestimmt, der im physikalisch-chemischen Institut der Universität Leipzig seit Jahren verwendet wird und im Handbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen von W. Ostwald und R. Luther abgebildet ist. Das Prinzip ist, die Zeit zu bestimmen, welche gewisse Flüssigkeitsquantitäten brauchen zum Durchfließen kapillarer Röhren. Während Wasser bei 21° C. 1′34,2″ brauchte, war die Durchflußzeit der 17,5%igen Rohrzuckerlösung 2′27,2″, die der 29%igen Kochsalzlösung 2′27,4″, die der 42,5%igen Glaubersalzlösung 2′27,0.

---

[1]) Siehe besonders Schierbeck, Skand. Arch. f. Physiol. 3, 344. — R. O. Herzog, Ztschr. f. physiolog. Chem. 48, 222.

[2]) Ztschr. f. physiolog. Chem. 42, 70.

Tabelle IV.

10 Minuten Belichtung (Sonne; Tem. — 1° C.). Drehung wurde nach 21 Stunden Invertierung bestimmt.

	Drehung	Invertierung in %Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz in %
29 % ClNa-Lösung + Invert. belichtet + sec. Wasser	+5° 00′	33,33	0
Wasser + „ „ + „ ClNa	+5° 00′	33,33	
29 % ClNa-Lösung + „ dunkel + „ Wasser	+0° 00′	100	
42,5 % SO_4Na_2-Lös. + „ belichtet + „ Wasser	+5° 19′	29,8	
Wasser + „ „ + „ SO_4Na_2	+5° 17′	29,4	— 0,4
42,5 % SO_4Na_2-Lös. + „ dunkel + „ Wasser	— 0° 24′	100	
Wasser + „ belichtet + „ Wasser	+4° 55′	28,7	
„ + „ dunkel + „ „	— 1° 30′	100	

45 Minuten Belichtung (zerstreutes Tageslicht, trüber Tag) Invertierungsdauer 7 Uhr.

	Drehung	Invertierung in %Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
21 % Harnstoff + Invert. belichtet + sec. Wasser	+5° 17′	64,9	0
Wasser + „ „ + „ Harnstoff	+5° 17′	64,9	
21 % Harnstoff + „ dunkel + „ Wasser	+4° 05′	100	
21,6 % Glyzerin + „ belichtet + „ Wasser	+5° 16′	67,6	+ 0,6
Wasser + „ „ + „ Glyzerin	+5° 15′	68,2	
21,6 % Glyzerin + „ dunkel + „ Wasser	+4° 23′	100	
Wasser + „ belichtet + „ Wasser	+4° 00′	57,6	
„ + „ dunkel + „ „	+1° 25′	100	

Somit haben auch die hochprozentigen Lösungen von Kochsalz, Glaubersalz, Harnstoff und Glyzerin die Schädigung des Invertins durch Licht nicht zu hemmen vermocht.

Es wurden nun noch zwei weitere Körper untersucht, nämlich Glykokoll in 13 %iger Lösung und Mannit in 16 %iger Lösung. Die 13 %ige Glykokolllösung ist 2fach molekular der 16 %igen Mannitlösung, letztere wiederum 2fach molekular der 15 %igen zum

Vergleiche mit in die Versuchsreihe einbezogenen Rohrzuckerlösung.

Tabelle V.

Belichtungsdauer 11 Minuten Wintersonne. Temperatur 0° C. Invertierungszeit 8 Stunden. Um die Invertierung bei gleichem Gehalt an Rohrzucker in den einzelnen Versuchen (3 g zu 25 ccm Flüssigkeit) vor sich gehen zu lassen, wurde dem Rohrzuckerversuch, der nach der Mischung bereits 1,5 g enthielt, noch 1,5 g zugegeben.

	Drehung	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
13 % Glykokoll-Lös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	+5° 50′	26,4	0
Wasser + „ „ + „ Glykokoll	+5° 50′	26,4	
Glykokoll-Lös. + „ dunkel + „ Wasser	+1° 10′	100	
16 % Mannit-Lös. + „ belichtet + „ Wasser	+5° 51′	30,9	+3,3
Wasser + „ „ + „ Mannit	+6° 08′	27,6	
Mannit-Lös. + „ dunkel + „ Wasser	+2° 10′	100	
15 % Rohrzuckerlös. + „ belichtet + „ Wasser	+3° 30′	66,4	+32,8
Wasser + „ „ + „ Rohrzuckerlösung	+6° 05′	23,6	
Rohrzuckerlös. + Invert. dunkel + sec. Wasser	+1° 29′	100	
Wasser + „ belichtet + „ Wasser	+6° 01′	24,7	
Wasser + „ dunkel + „ „	+1° 29′	100	

Glykokoll war wirkungslos, Mannit dagegen zeigte eine schwache hemmende Wirkung auf die Lichtschädigung. Gegenüber Rohrzucker ist dieselbe aber kaum nennenswert, trotz der doppelten molekularen Konzentration.

Versuche mit Kohlehydraten.

Ich will nun auf die Untersuchung von Stoffen übergehen, die dem Rohrzucker chemisch nahe stehen: d-Glukose, d-Fruktose, d-Mannose, d-Galaktose, Milchzucker, Malzzucker, Stärke und Dextrin. Vorausgehend will ich erwähnen, daß im Gegensatz zu den bisherigen Stoffen die Gruppe der Glykosen ($C_6H_{12}O_6$) sowie die des Rohrzuckers ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ähnlich wirken wie Rohrzucker selbst, daß aber die Zellulosegruppe (Stärke und Dextrin) keine Wirkung zeigt. Ich beginne mit dem Versuch, bei

dem die verwendeten Lösungen von d-Glukose, d-Fruktose, Milchzucker und Rohrzucker gleiche „relative“ Reibung hatten. Es war dies eine 16,5%ige Milchzuckerlösung, eine 17,5%ige Rohrzucker-, d-Glukose- und d-Fruktose-Lösung. Sie hatten bei 21° C. eine Durchströmungsgeschwindigkeit von 2′ 27,0—27,5″ gegenüber Wasser von einer solchen von 1′ 34,2″.

Tabelle VI.

Belichtungsdauer 10 Minuten. Wintersonne. Temperatur 1° C. Invertierungszeit 7 Stunden.

Da die hier verwendeten Körper selbst drehen, müssen die abgelesenen Drehungen korrigiert werden, indem die diesen Körpern eigene Drehung von der abgelesenen abgezogen resp. zugezählt wird. Die 17,5%ige d-Glukoselösung, verdünnt mit 5 ccm Ferment und 10 ccm Wasser auf 10 ccm Lösung, hatten eine Eigendrehung von + 3° 36′, die 17,5%ige d-Fruktoselösung — 6° 41′, die 16,5%ige Milchzuckerlösung + 3° 32′.

Um ferner bei den vier Körpern die gleiche Menge Rohrzucker (3 g auf 25 ccm Lösung) zur Invertierung zu bringen, wurde dem Rohrzuckerversuch, der nach der Mischung bereits 1,75 g Rohrzucker in 25 ccm enthielt, noch 1,25 g Rohrzucker zugegeben.

	Drehung	Korrigiert	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
17,5 % d-Glukoselös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	+ 7° 42′	+ 4° 06′	61,1	33,1
Wasser + „ „ + „ d-Glukose	+ 9° 32′	+ 5° 56′	28,0	
d-Glukoselös. + „ dunkel + „ Wasser	+ 5° 32′	+ 1° 56′	100	
17,5 % d-Fruktoselös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	— 1° 15′	+ 5° 26′	38,7	25,1
Wasser + „ „ + „ Frukt.	+ 0° 05′	+ 6° 46′	13,6	
d-Fruktoselös. + „ dunkel — „ Wasser	— 4° 32′	+ 2° 09′	100	
16,5 % Milchzuck.-L. + Invert. belichtet + sec. Wasser	+ 8° 55′	+ 5° 23′	34,7	2,8
Wasser + „ „ + „ Milchz.	+ 9° 05′	+ 5° 33′	31,9	
Milchzuck.-L. + „ dunkel + „ Wasser	+ 4° 55′	+ 1° 23′	100	
17,5 % Rohrzuck.-L. + Invert. belichtet + sec. Wasser	+ 3° 30′		62,7	40,4
Wasser + „ „ + „ Rohrz.	+ 6° 05′		22,3	
Rohrzuck.-L. + „ dunkel + „ Wasser	+ 1° 07′		100	
Wasser + „ + Wasser belichtet	+ 6° 07′		23	
„ + „ + „ dunkel	+ 1° 05′		100	

Aus diesem Versuche ergibt sich, daß in äquiviskösen Lösungen Rohrzucker am meisten die Schädigung des Lichtes zu

hemmen vermag; die Hemmung beträgt 40%; dann folgt die d-Glukose (33%), dann die d-Fruktose (25%), dann Milchzucker (2,8%). Von der Viskosität allein hängt also diese Wirkung nicht ab. Da diese äquiviskösen Lösungen auch alle ziemlich gleiche Konzentration haben, kann diese Hemmung auch mit der Konzentration allein nicht zusammenhängen, zumal ja die noch höher konzentrierten Salzlösungen, sowie Harnstoff und Glyzerin unwirksam waren. Endlich ist auch die molekulare Konzentration nicht die Ursache, da die verwendeten Rohr- und Milchzuckerlösungen auch annähernd gleich molekular sind.

Ferner wurden noch d-Mannose, d-Galaktose und Maltose in 15%igen Lösungen in die Untersuchung einbezogen. Die beiden ersteren wirken ähnlich der d-Fruktose ziemlich stark, die Maltose dagegen wie Milchzucker gering.

Tabelle VII.

Belichtungsdauer 10 Minuten. Wintersonne; zeitweise von dünnen Nebeln umschleiert. Temperatur 0° C. Invertierungszeit 20 Stunden. Da die verwendeten Lösungen selbst drehen, müssen Korrekturen nach der Ablesung vorgenommen werden. Die Drehung der 15%igen Mannose nach der Verdünnung von 10 ccm auf 25 ccm ist + 0° 59′, die der 15%igen Galaktose + 5° 10′, die der 15%igen Maltose + 7° 01′.

	Drehung	Korrigiert	Invertierung in %, Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
15% Mannose + Invert. belichtet + sec. Wasser	+3° 15′	+2° 16′	80,2	+19,3
Wasser + " " + " Mannose	+4° 35′	+3° 36′	60,9	
15% Mannose + " dunkel + " Wasser	+2° 05′	+1° 06′	100	
15% Galaktose + Invert. belichtet + sec. Wasser	+8° 00′	+2° 50′	93,4	+28,4
Wasser + " " + " Galaktose	+9° 25′	+4° 15′	65,0	
15% Galaktose + " dunkel + " Wasser	+7° 40′	+2° 30′	100	

Belichtungsdauer 10 Minuten. Wintersonne; Temperatur 0° C. Invertierungsdauer 8 Stunden.

	Drehung	Korrigiert	Invertierung in %, Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
15% Maltose + Invert. belichtet + sec. Wasser	+12° 15′	+5° 14′	38,8	+7,7
Wasser + " " + " Maltose	+12° 42′	+5° 41′	31,1	
15% Maltose + " dunkel + " Wasser	+ 8° 40′	+1° 39′	100	
Wasser + Invert. belichtet + sec. Wasser	+ 6° 00′		24,9	
" + " dunkel + " "	+ 1° 29′		100	

Wie schon vorher angegeben wirken die Körper der Zellulose gruppe (Stärke, Dextrin) nicht. Von der Stärke wurde allerdings nur eine 1,5%ige Lösung versucht.

Tabelle VIII.

Belichtungsdauer 15 Minuten. Sonne; Invertierungszeit 7 Stunden. Die eigene Drehung der Stärkelösung war nach der Mischung 1° 12'.

	Drehung	richtig gestellt	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
1,5 % Stärkelös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	+ 7° 11'	+ 5° 59'	31,2	+ 0,5
Wasser + „ „ + „ Stärke	+ 7° 13'	+ 6° 01'	30,7	
Stärkelös. + „ dunkel + „ Wasser	+ 3° 50'	+ 2° 38'	100	

Belichtungsdauer 45 Minuten. Zerstreutes Tageslicht, trüber Tag; Invertierungszeit 6 Stunden. Die eigene Drehung des Dextrins in der 9,5%igen Lösung nach der Mischung + 5° 35', in der 19%igen Lösung nach der Mischung + 11° 30'.

	Drehung	richtig gestellt	Invertierung in % Dunkelversuch = 100 gesetzt	Differenz
9,5 % Dextrinlös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	+ 9° 19'	+ 3° 44'	56,5	— 0,2
Wasser + „ „ + „ Dextrin	+ 9° 18'	+ 3° 43'	56,7	
Dextrinlös. + „ dunkel + „ Wasser	+ 6° 25'	+ 0° 50'	100	
19,0 % Dextrinlös. + Invert. belichtet + sec. Wasser	+ 14° 50'	+ 3° 20'	60,9	0
Wasser + „ „ + „ Dextrin	+ 14° 50'	+ 3° 20'	60,9	
Dextrinlös. + „ „ + „ Wasser	+ 12° 10'	+ 0° 40'	100	

Bei den positiven Befunden mit den Kohlehydraten könnte der Einwand gemacht werden, daß ihre hemmende Wirkung auf die Lichtschädigung vielleicht nur eine scheinbare ist und sich dadurch erklären läßt, daß die Kohlehydrate das zur Sensibilisierung benützte Eosin in irgend einer Weise verändern und so seine photodynamische Wirkung abschwächen. Denkbar wäre dies, da ja z. B. die Eiweißkörper auch mit einer Reihe von verschiedenen chemischen Gruppen angehörenden sensibilisierenden Stoffen in Reaktion treten und so deren Sensibilisationsfähigkeit verringern resp. aufheben[1]). Daß dies aber nicht der Fall ist, kann man an einem Tierversuche zeigen. Es lassen sich ja bekanntlich Zellen und Zell-

[1]) G. Busck, Die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweißverbindungen. Biochem. Ztschr. 1, 425. 1906. Hier ist die weitere Literatur zitiert.

komplexe ähnlich wie die Fermente durch fluoreszierende Körper für Licht sensibilisieren. Zu diesem Zwecke wurden 2 Uhrschälchen mit 0,8 ccm einer Reinkultur von Paramaecium caudatum beschickt, außerdem mit 0,1 ccm einer 20%igen Rohrzucker- und 0,1 ccm einer 0,07%igen Eosinlösung (die Konzentration des Eosins ist somit nach dem Mischen $^1/_{10000}$ mol., somit gleich der bei der Belichtung des Invertins benutzten Konzentration). Zwei weitere Uhrschälchen wurden ebenso beschickt; nur kam an Stelle des Rohrzuckers die gleiche Menge Wasser. Je ein Schälchen mit und ohne Zucker wurde in der Sonne belichtet und je eines im Dunkeln gehalten. Es ergab sich, daß nach 5 Minuten in den beiden belichteten Schälchen die Tiere nur mehr Rollbewegungen machten und nach weiteren 3 Min. jegliche Bewegung einstellten. Die im Dunkeln gehaltenen Tiere waren selbst nach mehreren Stunden noch unbeeinflußt. Somit ist bis zum Absterben der Tiere (Sistierung der Bewegung) kein Unterschied wahrzunehmen, ob bei der photodynamischen Wirkung des Eosins Rohrzucker zugegen ist oder nicht. Der Wirkungsgrad ist genau der gleiche.

Nach der Sistierung der Bewegung stellen sich allerdings Verschiedenheiten ein, die aber nicht auf die abschwächende Wirkung des Sensibilisierungsvermögens von Eosin bezogen werden dürfen. Bei dem Präparate, bei welchem kein Rohrzucker zugegen war, trat bald Quellung und Zerfall der Tiere ein, bei dem aber, das Rohrzucker enthielt, behielten dieselben sehr lange ihre ursprüngliche längliche Form. Es rührt dies davon her, daß durch den Zusatz von 2% Rohrzucker eine gewisse Fixation der abgestorbenen Zelle eintritt. Das gleiche ist nämlich der Fall, wenn für Paramäcien giftige Stoffe im Dunkeln auf diese Tiere einwirken. Setzt man Chinin 1:10000 Paramäcien im Dunkeln zu, so tritt nach ca. 15 Minuten Stillstand der Tiere ein und nach weiteren 10 Minuten kommt es zur Quellung und zum Zerfall. Wird aber dem Chinin 2% Rohrzucker beigegeben, so tritt dieser Zerfall nicht ein und selbst nach 24 Stunden ist die Form der abgestorbenen Tiere noch erhalten.

Somit ist dem oben gemachten Einwande, daß das Sensibilisierungsvermögen des Eosins durch den Zutritt der Kohlehydrate abgeschwächt werden könnte, die Begründung entzogen.

Es ist also erwiesen, daß wie der Rohrzucker auch noch eine Reihe anderer Körper aus der Gruppe der Kohle-

hydrate und zwar die ganze Gruppe der Hexosen, sowie die des Rohrzuckers die Eigenschaft besitzen, die schädigende Wirkung des Lichtes auf Invertin bei Sauerstoffanwesenheit zu hemmen. Es kann somit von einer Verschiedenheit der Lichtwirkung auf „ruhendes“ oder „tätiges“ Ferment nicht mehr die Rede sein.

Alle anderen nicht zu diesen Gruppen gehörenden Körper, wie neutrale Salze, Harnstoff, Glyzerin usw. zeigten keine solche Hemmung. Nur bei Mannit war sie, wenn auch sehr gering, vorhanden.

Mit der molekularen Konzentration kann diese Hemmung, wie aus Tabelle VI hervorgeht, nicht im Zusammenhange stehen, ebenso auch nicht mit der inneren Reibung. Ein Grund dafür, daß gerade die chemisch sich sehr nahe stehenden Kohlehydrate diese Wirkung haben, kann zurzeit nicht angegeben werden, vielleicht handelt es sich um eine Adsorptionserscheinung, durch die das Ferment vor der Lichtschädigung geschützt wird.

Es lag nun die Frage nahe, ob die Schädigung des Invertins durch Wärme sich ebenfalls durch Zusatz bestimmter Stoffe einschränken läßt. Ich habe mit H. Schmorell Versuche in dieser Richtung gemacht und hebe hier nur das Hauptergebnis hervor, nämlich, daß alle bisher untersuchten Stoffe z. B. die Neutralsalze, Glykokoll, Glyzerin, Mannit, sämtliche Kohlehydrate bei ihrer Anwesenheit die Wärmeschädigung auf Invertin stark hemmen. Diese Befunde stehen im Einklang mit bereits gemachten Beobachtungen. So hat A. Mayer[1]) gefunden, daß Rohrzuckerzusatz die Schädigung des Invertins durch Wärme hemmt. Er schreibt in seiner Zusammenfassung[2]), „feststehend ist also die Tatsache, daß Invertinlösungen für sich allein schon bei Temperaturen in ihrer Fermentkraft geschädigt werden, denen sie in voller Tätigkeit begriffen Trotz zu bieten vermögen, eine Tatsache, wie uns scheint, von der größten Wichtigkeit“.

Ein ähnliches Verhalten konstatierte C. J. Lintner bei der Einwirkung der Wärme auf Diastase[3]). Diese wird bei Gegenwart

[1]) Weitere Beiträge zur Kenntnis der Wirkung des Invertins. Ztschr. f. d. ges. Brauwesen. Neue Folge **5**, 86.

[2]) Studien über Diastase. Ztschr. f. ges. Brauwesen. Neue Folge **11**, 77.

[3]) Über den Einfluß der Neutralsalze auf Serumalexine, Enzyme, Toxalbumin, Blutkörperchen und Milzbrandsporen. Arch. f. Hygiene **17**, 138—178 (Jubelband 1893).

von Stärke durch höhere Temperatur bei weitem weniger geschädigt, als wenn sie nur in wässeriger Lösung erwärmt wird. Der Unterschied beträgt ca. 50%. Lintner erscheint es wahrscheinlich, daß obige Erscheinung nicht etwa auf einen direkt schützenden Einfluß der Stärke bzw. der Umwandlungsprodukte derselben beruhe, sondern auf der durch die Anwesenheit derselben ermöglichten fermentativen Tätigkeit der Diastase. Die fermentative Tätigkeit wäre demnach das schützende Moment.

Die gesteigerte Resistenz der Enzyme gegen Erhitzen bei Anwesenheit von Neutralsalzen hat Buchner festgestellt[1]) und darauf hingewiesen, daß die Ursache hierfür in der durch die Salze ausgeübten Wasserentziehung liegen dürfte. Wie die Enzyme verhielten sich auch die Serumalexine, die Toxalbumine, Blutkörperchen und Milzbrandsporen. Ohne diese Arbeit von Buchner zu kennen, sind wir bei Anordnung unserer Versuche von ähnlichen Gesichtspunkten ausgegangen. Ausführlicher will ich darauf jetzt nicht eingehen, sondern später in Verbindung mit H. Schmorell darüber berichten.

Es besteht somit auch hier wiederum ein Gegensatz zwischen Lichtschädigung und Wärmeschädigung. Erstere kann nennenswert nur durch Anwesenheit gewisser Kohlehydrate hemmend beeinflußt werden, letztere durch die Gegenwart fast aller bisher von uns in dieser Richtung untersuchten Stoffe.

---

[1]) Anm. [5]) S. 501.

Über die Einwirkung kolloidaler Gifte auf Paramäcien.

Von

Dr. W. Hausmann und **Dr. W. Kolmer.**

(Aus dem physiologischen Institut der Hochschule für Bodenkultur in Wien. Professor Durig.)

(Eingegangen am 4. Februar 1907.)

Das Studium der Einwirkung kolloidaler Gifte auf einzellige Organismen hat Interesse erlangt, weil in letzter Linie die Vergiftung höherer Tiere durch Toxine auf die Vergiftung von einzelnen Zellen des Organismus durch kolloidale Gifte zurückzuführen ist. Es lag daher nahe, den Einfluß kolloidaler Substanzen auf einzellige Lebewesen — wir wählten Paramäcien, zu untersuchen.

Natürlich ist ohne weiteres zuzugeben, daß ein direkter Vergleich der Paramäcien, deren eine Zelle alle Funktionen versieht, mit einer spezifische Funktionen versehenden Zelle irgend eines Organes nur mit Vorbehalt ermöglicht ist. Doch scheint das Verhalten solcher einzelliger Organismen gegen kolloidale Substanzen den einfachsten Fall einer Vergiftung durch kolloidale Gifte darzustellen.

Hier seien in Kürze einige Beobachtungen über das Verhalten von Paramäcien gegen kolloidale Gifte mitgeteilt. Da äußere Umstände eine Fortführung dieser Versuche vorläufig nicht gestatten, seien sie ganz kurz besprochen, um uns eine weitere Mitarbeit in diesem speziellen Falle zu ermöglichen. Zur Untersuchung kamen Tannin, Sapotoxin, kolloidales Quecksilber, Abrin, Ricin und das diesen Giften sehr nahe stehende Colchicin. Vor allem sollte untersucht werden, ob die natürliche Immunität der Infusorien

gegen verschiedene Toxine in ursächlichem Zusammenhange steht mit der kolloidalen Natur dieser Gifte. Gengou[1]) hat gezeigt, daß Paramäcien unempfindlich sind gegen Diphtherie- und gegen Tetanustoxin. Es war uns bis zu Abschluß unserer Versuche unbekannt gewesen, daß Th. Bokorny[2]) schon auf die große Resistenz von Infusorien gegen Abrin und Ricin hingewiesen hatte, was wir durchaus bestätigen konnten. Vor kurzem hat Landsteiner[3]) gezeigt, daß Trypanosomen von Saponin vergiftet werden, während Bakterien Saponin immun sind. Unsere Ergebnisse seien in der nachstehenden Tabelle mitgeteilt. Die Paramäcienauf-

Tabelle I.

	Menge der Giftlösung ccm	Menge des außerdem zugesetzten Brunnenwassers ccm	Menge der Paramäcienaufschwemmung ccm	Bemerkung
Sapotoxin 0,1 % Lösung in Brunnenwasser.	0,1	0,9	2,5	Nach mehreren Stunden normal.
	0,2	0,8	2,5	Nach mehreren Stunden fast alle normal.
	0,3	0,7	2,5	Nach mehreren Stunden nur vereinzelt am Leben.
	0,4	0,6	2,5	Nach einigen Stunden alles tot.
Tannin 0,1 % in Brunnenwasser.	0,3	0,7	2,5	Nach 24 Stunden einzelne am Leben.
	0,4	0,6	2,5	Nach 24 Stunden einzelne am Leben.
	0,5	0,5	2,5	Sehr bald alle tot.
Dialysierte salzfreie Abrinlösung.	1	—	1	Nach mehreren Tagen normal; 0,2 ccm der Lösung agglutinierte deutlich 5 ccm 2 % Kaninchenblut.
Dialysierte salzfreie Ricinlösung.	1	—	0,5	Nach mehreren Tagen normal; 0,05 ccm dieser Lösung agglutinierte 5 ccm 2 % Kaninchenblut.

[1]) Ann. de l'inst. Pasteur **11.** 1897 zit. nach Metschnikoff, Immunität. Jena **1902.**

[2]) Pflügers Archiv **64,** 305.

[3]) Centralbl. f. Bakteriologie **38,** 542.

schwemmung in reinem Brunnenwasser war durch Aufsteigenlassen der Paramäcien in einer langen Röhre gewonnen worden. Diese durch negative Geotaxis von den zahlreichen Verunreinigungen der Ausgangskultur befreiten Paramäcien sind nach den Erfahrungen von Barrat[1]) ganz ungeschädigt, im Gegensatz zu den durch Zentrifugieren gereinigten.

Aus der vorstehenden Tabelle geht klar die große Verschiedenheit in dem Verhalten einzelliger Organismen gegen kolloidale Gifte hervor. Der kolloidale Charakter an sich ist nicht bestimmend für die Art der Giftwirkung.

Jedenfalls ist die natürliche Immunität einzelliger Lebewesen gegen Toxine unabhängig von der kolloidalen Natur dieser Gifte. Denn die bisher untersuchten kolloidalen Toxine (Diphtherietoxin, Tetanustoxin, Abrin, Ricin) sind ungiftig für Paramäcien, die ebenfalls kolloidalen Körper Tannin und Saponin für sie hochtoxisch.

Kolloidales Quecksilber, Hyrgolum der Firma Heyden, wurde ebenfalls untersucht. Es wirkt zweifellos giftig auf Paramäcien, doch ließen sich vielleicht wegen der Verschiedenheiten der Kulturen keine sicheren Zahlen ermitteln. So wirkten in einem Falle 0,05 ccm der Lösung (0,05 g auf 1000 ccm Wasser) sehr giftig auf 0,5 ccm einer Paramäcienkultur, während in anderen Versuchen die 10fache Menge ohne Wirkung blieb. Durch Erhöhung der Temperatur ließ sich die Giftigkeit des kolloidalen Quecksilbers ungemein verstärken. Bei 33° C. — einer an sich für Paramäcien ganz unschädlichen Temperatur — gingen die Infusorien bei Zusatz von 0,1 ccm der Quecksilberlösung zu 0,5 ccm Kultur in 50 Minuten ein, bei 15° C. starben die Tiere nach etwa 6 Stunden bei derselben Konzentration. Das Präparat war längere Zeit dialysiert worden. Es kann sich hier demnach nicht um Giftwirkung in der Wärme stärker dissoziierter Salze handeln.

Ganz besonders deutlich aber konnte der Einfluß der erhöhten Temperatur bei Einwirkung von Colchicin auf Paramäcien beobachtet werden. Colchicin — wir verdanken das ganz reine, kristallisierte Präparat der Freundlichkeit von Herrn Professor Zeisel — wurde untersucht, da es in vieler Hinsicht den Toxinen

[1]) O. W. Barratt, Ztschr. f. allgem. Physiol. 5, 16.

und anderen kolloidalen Giften sehr nahe steht. Es wirkt mit Inkubationzeit (Rossbach[1]); Kaltblütler sind dagegen nahezu unempfindlich (Jakobj[2]), während es für Warmblütler ungemein giftig ist. Auch in seinem Verhalten gegen Winterschläfer ist es den Toxinen und anderen kolloidalen Giften sehr ähnlich[3]). Fledermäuse werden im wachen Zustande mit Inkubationszeit getötet, im Winterschlafe sind sie immun gegen diese Art der Colchicinvergiftung. Ebenso kann man, wie bei Toxinen und den kolloidalen Giften Tannin und Saponin auch bei Colchicin die Inkubationszeit durch den Winterschlaf erheblich verlängern[4]). Es sei hier darauf hingewiesen, daß trotz aller Ähnlichkeit des Colchicins mit den Toxinen doch tief greifende Unterschiede in ihrer Wirkung auf den Organismus bestehen müssen. Trotz der großen Übereinstimmung in der Art der Giftwirkung fehlt bei Colchicin das Hauptmerkmal der Toxine, die Immunisierungsmöglichkeit. Es ist dem einen von uns (H.) trotz zahlreicher Versuche an weißen Mäusen nie gelungen, auch nur die Spur einer Gewöhnung an Colchicin zu erzielen, weder bei subkutaner Applikation, noch bei Beibringung des Giftes per os. Die Wirkung des Colchicins auf Paramäcien geht aus nachfolgender Tabelle hervor. Das Colchicin wurde gewogen und direkt in der Paramäcienaufschwemmung gelöst. (Tab. II.)

Wir sehen hier vor allem eine sehr erhebliche, aber nicht absolute Resistenz der Paramäcien gegenüber Colchicin. Durch die Erhöhung der Temperatur wird die Wirkung des Colchicins ganz ungemein gesteigert, so daß bei Zimmertemperatur indifferente Konzentrationen, — die Tiere

---

[1]) Pflügers Archiv **12**, 308.

[2]) Archiv f. experim. Pathol. und Pharmakol. **27**, 119.

[3]) W. Hausmann, Pflügers Arch. **118**, 317.

[4]) Eine im chemischen Laboratorium von Professor Zeisel im Gange befindliche Untersuchung hat ergeben, daß dem gelösten Colchicin bei niedriger Temperatur eine Molekulargröße von etwa 800, bei höherer Temperatur von etwa 400 zukommt, entsprechend der schon vor Jahren von Zeisel ermittelten Colchicinformel $C_{22}H_{25}NO_6$ beziehungsweise $(C_{22}H_{25}NO_6)_2$. In seiner dimerer Form nähert sich demnach das Colchicin den Kolloiden, was auch — wie oben auseinandergesetzt — in seinem physiologischen Verhalten zum Ausdruck gekommen war.

Tabelle II.

Colchicinlösung in %	Wirkung bei 15 %	Wirkung bei 33° C.
0,35	Nach 4 Tagen normal	—
1	Nach 4 Tagen normal	Nach 3 ½ Stunden alles tot.
1,25	Nach 4 Tagen normal	—
1,60	Nach 7 Stunden normal	Nach 1 Stunde alles tot.
3	Nach 3 Stunden fast alles tot.	Nach 20 Minuten alles tot.

lebten bis zu 4 Tagen ohne merkliche Schädigung — in der Wärme hochtoxisch wirkten. Es liegt hier ein ganz ähnliches Verhältnis vor, wie es bei Vergiftung von winterschlafenden und wachen Fledermäusen mit Colchicin beobachtet worden ist.

Es sei hier auf die interessanten Ausführungen von A. Kanitz hingewiesen, der ähnliche Beobachtungen vor allem mit der Beschleunigung der Reaktionszeit durch die erhöhte Temperatur in Verbindung bringt.[1])

---

[1]) Biolog. Centralblatt **27**, 11. Nr. 1.

Über eine neue klinische Methode der quantitativen Bestimmung von Frauenmilchbutter.

Von

Dr. Arturo Primavera.

(Istituto di Chimica Fisiologica della Regia Università di Napoli diretto dal Professore P. Malerba.)

(Eingegangen am 9. Februar 1907.)

Unter den bisher zur Bestimmung des Fettes in der Milch gebrauchten, annähernd oder sehr genauen Methoden gibt es keine einzige, die in der Klinik anwendbar ist.

Die Laktoskope, die Cremometer, die Laktobutyrometer sind nur zur physiologischen, hygienischen und industriellen Untersuchung anwendbar. Obgleich dieselben zur raschen und annähernden Bestimmung der in der Milch enthaltenen Butter, welche man in Verkauf bringt, hinreichend sind, so kann man sie, streng genommen, nicht zur chemischen Untersuchung der Frauenmilch anwenden.

Was die genauen Methoden anbelangt — kurz gesagt, die von Soxhlet — so wäre ihre Verwendung zu klinischen Untersuchungen unzweckmäßig. Einerseits finden wir Schwierigkeiten in der langen Dauer der Prüfung, und andererseits sind genaue Instrumente dazu erforderlich, welche wegen ihres Preises und ihrer Betriebsart sich nicht in einem gewöhnlichen klinisch-chemischen Laboratorium befinden können. Im Hinblick auf die Ziele dieser chemischen Arbeiten ist es ja begreiflich, daß man stets die Leichtigkeit und Kürze des Verfahrens höher anschlägt als die streng wissenschaftliche Genauigkeit der Ergebnisse.

Bouchut[1]) schlug im Jahre 1886 vor, die Buttermenge auf Grund der Anzahl der in einem cmm Milch vorhandenen Fettkügelchen zu bestimmen.

Das war der erste Antrieb für eine klinische Methode, Bouchut vermochte sie aber nicht in der von ihm beabsichtigten Weise zu verwenden, da er die bedeutenden Fehlerquellen nicht sah, so daß er sich, ohne die nötigen Korrektionen und Modifikationen vorzunehmen, der einfachen Zählung der Kügelchen bediente, woraus er nicht nur hinsichtlich der Buttermenge, sondern auch der Höhe des spezifischen Gewichts der Milch einen Schluß ziehen wollte. Und so behauptete er unter anderem, daß bei beträchtlicher Abnahme der Zahl der Kügelchen, auch das spez. Gewicht der Milch im nämlichen Verhältnis sinke.

Finizio bemerkt mit Recht in seiner jüngst erschienenen Arbeit[2]), diese Behauptung sei irrtümlich, indem er hierbei aufmerksam macht, daß die Butter ein geringeres spez. Gewicht als das destillierte Wasser hat, sodaß die Zahl der Kügelchen einer Milch zum spez. Gewicht der Milch umgekehrt proportional sein sollte.

Obwohl Friedmann[3]) im Jahre 1902 die Methode des Globulimeters empfahl, hatte diese bisher wenig Glück gehabt, und Finizio übt in seiner oben genannten Arbeit eine strenge Kritik der Methode, indem er folgendes behauptet: Die Zählung der Milchkügelchen kann nicht die direkte Dosierung der Butter ersetzen, denn es gibt keine feste Beziehung zwischen der Zahl der Kügelchen im cmm und der prozentualen Fettmenge. Der Mangel einer solchen Beziehung ist hauptsächlich dem sehr veränderlichen Umfang der Milchkügelchen zuzuschreiben.

Finizios Bemerkung ist höchst überzeugend, dennoch aber nicht derart, daß man die Methode des Globulimeters beiseite legen sollte.

Obwohl die von Bouchut vorgeschlagene Methode in der Praxis die genauen Methoden zur Bestimmung der Butter nicht ersetzen kann, so hat sie doch einen besonderen Wert in ihrer

---

[1]) Bouchut, Hygiène de la première enfance. Paris, 1886.

[2]) Finizio, Sul valore della conta dei globuli per conoscere la quantità del burro ecc. — La Pediatria. 1. 1902.

[3]) Friedmann, Deutsch. med. Woch. 1902.

Auffassung, so daß sie, wenn man die von Finizio angegebenen Übelstände beseitigen könnte, in der Klinik gewiß allen anderen bis jetzt gebrauchten vorzuziehen wäre; es wäre eine kurze, leichte, ziemlich genaue Methode, bei welcher sehr wenig Material in Gebrauch kommen würde.

In der ersten Versuchsreihe suchte ich vor allem nachzuweisen, daß zwischen der Zahl der Kügelchen und dem Fettgehalte der Milch kein konstantes Verhältnis besteht, derart daß durch die einfache Zählung mit dem Globulimeter nach Friedmann eine zu klinischen Zwecken geeignete Methode der Butterbestimmung geschaffen sein dürfte.

Aus der folgenden zusammenfassenden Tabelle kann man die Inkonstanz dieses Verhältnisses entnehmen:

Beobachtung	Zahl der Kügelchen für einen cmm	Fettmenge % (Meth. Soxhlet) g	Beobachtung	Zahl der Kügelchen für einen cmm	Fettmenge % (Meth. Soxhlet) g
I	3270000	2,85	VII	2500000	3,12
II	5200000	3,05	VIII	3180000	3,26
III	3527000	2,83	IX	4200000	3,23
IV	3823000	2,54	X	2750000	2,80
V	6522000	2,63	XI	4014000	2,42
VI	2524000	2,86	XII	1628000	2,64

Es handelte sich darum, einige Modifikationen an der von Bouchut eingeführten Technik vorzunehmen, um zu erreichen, daß man mittels einer ziemlich einfachen Berechnung und ohne Hilfe einer Konstanten die Fettmenge einer Milch (sei sie in Volumen oder Gewicht) durch Zählung und Messung der Kügelchen bestimmen kann.

Mit wenigen Worten will ich meinen Gedanken kundgeben:

Es wird im allgemeinen anerkannt, daß das Milchkügelchen eine Kugel darstellt. Wie man weiß, lehrt die Geometrie, daß man, wenn der Durchmesser einer Kugel bekannt ist, bei Anwendung einer speziellen Formel das Volumen derselben leicht finden kann.

In unserem Falle wird es genügen vorsichtig das Okular-Mikrometer zu gebrauchen, um den Durchmesser einer gewissen Anzahl Milchkügelchen zu erhalten.

Bei dessen Kenntnis kann man folgende Formel aufstellen:

$$V = \frac{1}{6} \pi d^3$$

Beim ersten Blick scheint sie sehr kompliziert, hauptsächlich wegen der Abneigung, die wir Ärzte gegen mathematische Formulierungen hegen, in der Tat aber ist sie einfach genug.

In der Tat ist der Wert von π bekannt und konstant, indem er dem Wert von 3,14 gleich ist. Was den Wert d betrifft, so wird derselbe durch den Gebrauch des Okular-Mikrometers ermittelt.

Mit einem praktischen Beispiel will ich die Berechnungen erklären, welche ich meinen Untersuchungen zugrunde legte.

Nehmen wir an in einer Milchprobe 1800000 Kügelchen in einem cmm gefunden zu haben, wovon man 100 mißt und dabei 28 aus 1 μ, 12 aus 3 μ, 30 aus 2 μ, 20 aus 5 μ, und 10 aus 6 μ findet. Der durchschnittliche Diameter eines Kügelchens wird dann sein

$$\frac{(28 \cdot 1) + (12 \cdot 3) + (30 \cdot 2) + (20 \cdot 5) + (10 \cdot 6)}{100}$$

$$\text{d. h. } \frac{284}{100} = 2{,}84\,\mu$$

Und der Durchschnittswert eines Kügelchens wird

$$V = \frac{1}{6}\,\pi\,(2{,}84)^3 = \frac{1}{6}\,3{,}14\,(2{,}84)^3$$

$$= 0{,}54 \cdot 22{,}906304 = 11{,}9112\,\mu^3 \text{ sein.}$$

Da aber in einem cmm Milch 1800000 Kügelchen sind, so wird das Fettvolumen, welches in einem cmm Milch enthalten ist, von $11{,}9112 \times 1800000 = 21440160\,\mu^3$ sein.

Folglich wird das in einem Liter Milch enthaltene Fettvolumen gleich $21\,440\,160 \times 1\,000\,000 = 21\,440\,160\,000\,000\,\mu^3$ sein.

Um nun die Zahl in ccm auszudrücken, wobei zu beachten ist, daß ein ccm gleich 1 000 000 000 000 kubischen Mikromillimeter ist, muß man mit dem Komma 12 Ziffern gegen links rücken und so findet man

ccm: 21,44016.

Diese Zahl wird nun den Inhalt des Fettes (in ccm ausgedrückt) für jedes Liter Milch vorstellen.

Man kann aber noch weiter schreiten, indem man die Zahl, die das Fettvolumen ausdrückt, in eine andere Zahl, welche das Fettgewicht ausdrückt, umrechnet.

Man hätte nur die erhaltene Zahl durch die das spez. Gewicht der Butter ausdrückende Zahl zu dividieren, welche nach Hammarsten im Durchschnitt 0,97 beträgt.

Und dann ist

$$\frac{21,44016}{0,97} = 22,1032 \text{ Gramme.}$$

Die Zahl stellt die Quantität Butter dar, welche in einem Liter Milch enthalten und als Gewicht ausgedrückt ist.

Für jede Milchprobe wurde eine Kontrollbestimmung mit der Methode von Soxhlet ausgeführt.

Der Kürze wegen werde ich die Ergebnisse meiner Beobachtungen in einer Tabelle zusammenfassen.

Beobachtung	Zahl der Kügelchen für einen cmm	Durchschnittsdurchmesser eines Kügelchens µ	Fettgewicht in einem Lit. Milch g	Fettgewicht in einem Liter Milch durch die Kontrollmethode bestimmt (nach Soxhlet) g	Absoluter Fehler	Prozentualer Fehler
XIII	125000	2,84	15,03	13,05	+ 1,98	15,17
XIV	170000	3,53	39,05	38,16	+ 0,87	2,27
XV	3000000	2,20	17,12	19,00	— 1,88	9,94
XVI	1600000	3,08	25,06130	25,061	0	0
XVII	2100000	2,55	18,6668	20,72	— 2,06	9,94
XVIII	3000000	2,49	24,8079	25,12	— 0,32	1,27
XIX	2250000	2,86	31,2492	30,29	+ 1,04	3,43
XX	1900000	3,30	36,7069	29,85	+ 6,85	22,94
XXI	2250000	3,05	34,2226	35,17	— 0,95	2,70
XXII	4100000	2,35	28,5245	30,60	— 2,08	6,79
XXIII	3000000	2,90	39,223	32,05	+ 7,17	2,37
XXIV	1200000	3,62	30,4730	30,65	— 0,18	0,58
XXV	5600000	1,70	14,7491	16,06	— 1,32	8,21
XXVI	3088000	2,80	36,3080	35,18	+ 1,12	3,18
XXVII	6010000	2,35	41,8128	40,76	+ 1,05	2,57
XXVIII	4200000	2,40	31,1253	29,15	+ 1,97	6,75
XXIX	7100000	2,00	30,40	31,00	— 0,60	1,93
XXX	210000	2,95	28,9012	26,75	+ 2,15	8,03
XXXI	3000000	2,90	39,223	39,54	— 0,32	0,80
XXXII	1800000	3,55	43,1707	42,96	+ 0,21	0,48

Wie man aus der vorstehenden Tafel entnimmt, ist der absolute Fehler von 0 bis 7,17, d. h. im Durchschnitt 1,70 g für jedes Liter Milch, wenn man dabei nicht rechnet, ob die Abweichung nach oben oder nach unten stattfindet.

Der prozentuelle Fehler ist zwischen 0 und 22,94, was ein Mittel von 6,46 pr. 100 darstellt: mit anderen Worten, auf jedes 100 g Fett, welches nach der von mir beschriebenen Methode dosiert wurde, kann ein Durchschnittsfehler von 6,46 gegenüber den mit der Methode von Soxhlet erhaltenen Resultaten vorkommen.

Technisches Verfahren.

Bevor ich die Milchprobe für die Untersuchung entnahm, habe ich immer getrachtet, eine gewisse Menge davon abzulassen um die im letzten Teil der Kanälchen stehende Milch zu entfernen, in welchen Kanälchen das Fett eine große Veränderung erfahren haben kann.

Nachdem ich die Brustwarze mit Äther und Alkohol gereinigt hatte, habe ich stets mit einem leichten Druck etwa 15 ccm Milch gesammelt.

Sofort schritt ich zur Zählung der Kügelchen mit dem nämlichen Verfahren, so wie man die roten Blutkörperchen zählt, wobei ich aber als Verdünnungsmittel anstatt der physiologischen Lösung destilliertes Wasser gebrauchte, indem ich in das Röhrchen bis zum Zeichen ansaugte.

Ich bediente mich dabei des Okular-Mikrometers 3 und des Objektivs 7* (Koristka).

Nebst der Zählung der Kügelchen führte ich gleichzeitig in jedem Gesichtsfelde die Messung einer gewissen Anzahl derselben aus, und gerade derjenigen, welche sich in einem gewissen Quadrant befanden.

Die Messung beschränkte sich auf 100 Kügelchen für jede Milchprobe.

Nach der Messung und der Zählung führte ich die Berechnung aus, indem ich dazu die angeführte Formel anwandte.

Bei dem praktischen Beispiel habe ich die Berechnung in allen ihren Einzelheiten übertragen, um die einzelnen Übergänge augenscheinlich zu machen; aber in der Praxis kann man die Berechnung kürzer und einfacher gestalten, wenn man einige Modifikationen in der Formel vornimmt.

Ich werde in kurzem meine Gedankenfolge ausdrücken, welche mir erlaubt hat, die ursprüngliche Formel zu modifizieren:

D — sei der Durchschnittsdurchmesser eines Kügelchen, in μ ausgedrückt.

v — Durchschnittsvolumen eines Kügelchen (in μ^3 ausgedrückt).

N — die in einem cmm Milch enthaltene Kügelchenzahl.

V — das in einem cmm Milch enthaltene und in μ^3 ausgedrückte Fettvolumen.

W — das in einem Liter Milch enthaltene, mit μ^3 ausgedrückte Fettvolumen.

W^1 — dasselbe mit ccm ausgedrückt.

d — Spez. Gewicht der Butter (= 0,97).

X — das in einem Liter Mich enthaltene, in Grammen ausgedrückte Fettgewicht.

Nach den ursprünglichen Formeln würden wir:

1. $v \times N = V.$
2. $N \times 1000000 = W$, d. h. $V \times 1000^2 = W.$
3. $\frac{W}{1000000000000} = W^1$, d. h. $\frac{W}{1000^4} = W^1$

als Resultat haben.

Um nun die Berechnung zu vereinfachen, können wir mit dem Buchstaben a die Zahl bezeichnen, welche man erhält, wenn man N durch 1000000, d. h. durch 1000^2 teilt.

Dann erhalten wir

$$4.\quad \frac{N}{1000^2} = a$$

und somit:

$$5.\quad N = a \times 1000^2.$$

Aber für die Formeln 1., 2., 3. wird man

$$6.\quad W^1 = \frac{v \times N \times 1000^2}{1000^4} \text{ haben,}$$

und dann für die Formel 5.:

$$7.\quad W^1 = \frac{v \times a \times 1000^2 \times 1000^2}{1000^4}$$

und somit:

$$8.\quad W^1 = \frac{v \times a \times 1000^4}{1000^4}$$

das heißt:

$$9.\quad W^1 = v \times a.$$

Aber wir wissen, daß

$$10.\quad v = {}^1/_6\, \pi D^3, \text{ d. h. } v = {}^1/_6\, 3{,}14\, D^3$$

und daß

$$11.\quad X = \frac{W^1}{0{,}97} (0{,}97 = \text{spez. Gewicht})$$

und dann, wenn man statt W^1 seinen in der Formel 9 ausgedrückten Wert an die Stelle setzt, erhalten wir

$$12.\quad X = \frac{v \times \alpha}{0{,}97}$$

und an die Stelle des v seinen in der Formel 10 ausgedrückten Wert

$$13.\quad X = \frac{\frac{1}{6}\, \pi\, D^3 \times \alpha}{0{,}97}$$

das heißt:

$$14.\quad X = \frac{\frac{1}{6}\; 3{,}14\; D^3 \times \alpha}{0{,}97},$$

und wenn man die in der Formel 14 angezeigten Berechnungen vollzieht, so wird man

$15.\quad X = 0{,}54\; D^3\, \alpha$ erhalten.

Diese letzte Formel ist entscheidend, und sie ist diejenige, welche man für jede Bestimmung der Milch anwenden wird.

Der Wert D wird mit dem Okular-Mikrometer bestimmt und den Wert α, wie schon gesagt, erhält man, wenn man die in einem cmm Milch enthaltene Kügelchenzahl durch 1000000 teilt.

Wenn man sich der so modifizierten Formel bedient, so fällt die Berechnung einfacher und kürzer aus.

Wenden wir nun diese neue Formel an, um eine Beobachtung, z. B. die XV., zu berechnen. Wir haben:

Zahl der Kügelchen in einem cmm 3000000.

Somit $\alpha = 3$.

Durchschnittsdurchmesser eines Kügelchens μ 2,2.

Somit $D^3 = \mu$ 10,608.

Und dann: $X = 0{,}54 \times 10{,}608 \times 3$

$= \text{Gramm } 17{,}1.$

Die Zahl ist nur bis zu dem Dezigramm genau; da aber mit der vorgeschlagenen Methode der wirkliche Fehler immer höher als $\frac{1}{2}$ g angenommen werden kann, was sich aus den angegebenen Beobachtungen erklärt, so kann man eine solche Zahl praktisch als genau betrachten.

Auszug der Resultate und Schlüsse.

Aus den ersten zwölf Beobachtungen, bei welchen die einfache Zählung der Kügelchen und die Kontrollbestimmung nach der Methode von Soxhlet, ohne Messung mit dem Okularmikro-

meter vorgenommen wurden, erweist sich offenbar der Mangel einer konstanten Beziehung zwischen der Kügelchenzahl und dem Fettgewichte in den einzelnen Milchprobemustern.

Die einfache Zählung der Kügelchen kann daher keinen ernsthaften Wert als Methode der Butterbestimmung haben.

Der Grund ergibt sich aus den folgenden Beobachtungen (XIII—XXXII), bei welchen die Zählung und die Messung der Kügelchen vorgenommen wurden.

Aus diesen Beobachtungen kann man tatsächlich entnehmen, daß der Durchmesser der Kügelchen der Milch sehr veränderlich ist, und daß im allgemeinen die Kügelchenzahl ihrem Volumen umgekehrt proportional ist.

So erklärt es sich dann, warum eine in einem cmm 1200000 Kügelchen enthaltende Milch (XXIV. Beob.) 30,47 g Butter in jedem Liter enthält, während eine andere mit einer größeren Zahl Kügelchen (5600000—XXV. Beob.) nur 14,74 g enthält. Die Zahl der Kügelchen war bei den benannten Beobachtungen offenbar umgekehrt proportional den Volumina, und in der Tat war im ersten Falle der Durchschnittsdurchmesser eines Kügelchens μ 3,62, im zweiten Falle hingegen μ 1,70.

Die Zählung der Kügelchen, welche mit dem Okularmikrometer gemacht wurde, hat im Gegenteil sehr befriedigende Resultate gegeben.

Mit der Anwendung der von mir angegebenen, speziellen Formel haben sich die Ergebnisse den mit der Methode Soxhlet erhaltenen sehr genähert, und sie sind manchmal sogar gleich oder beinahe (s. XVI., XVIII., XIX., XXIX., XXIV., XXXI., XXXII. Beob.) gleich gewesen.

Im allgemeinen erhielt man einen mehr oder weniger kleinen Fehler, immer aber auf genügend enge Grenzen beschränkt (von 0,21 bis 7,17 g für ein Liter).

Auf die großen Schwankungen achtend, welche unter physiologischen Bedingungen der Fettgehalt der Milch erfahren kann, begreift man, daß der angetroffene Fehler eigentlich kaum zu berücksichtigen wäre; trotzdem habe ich getrachtet, mir darüber Rechenschaft zu geben.

Untersuchen wir nun die Ursachen, wovon dieser Fehler abhängen könnte:

1. Fehler in der das sp. Gewicht ausdrückenden Zahl (0,97);
2. Fehler in der Formel, nach welcher man die Berechnung macht;
3. Materielle Berechnungsfehler;
4. Fehler in der Messung;
5. Fehler im Zählen.

Was die erste Fehlerquelle anbelangt, wenn sie wirklich bestände, so würde es kein Mittel geben, ihr auszuweichen, da man das sp. Gewicht für jede Milchprobe, eine nach der anderen, nicht bestimmen kann. Ich bediente mich immer einer das durchschnittl. sp. Gewicht der Butter ausdrückenden Zahl (0,97 nach Hammarsten), welche sich von dem sp. Gewicht der verschiedenen Milchproben nicht sehr entfernt und nur einen ganz leichten Fehler verursachen kann. Das geht auch aus der Tatsache hervor, daß die densimetrische Methode von Soxhlet diesen Fehlern unterworfen ist, weil Soxhlet selbst in seinen Tafeln das sp. Gewicht der Butter, bei jeder Temperatur, als feststehend hatte betrachten müssen.

Nur in einem einzigen Falle könnten die Fehler von der Formel herstammen, d. h. nur dann, wenn die Form des Fettkügelchens nicht kugelrund wäre, weil dann die obengenannte Formel irrtümlicherweise angewandt worden wäre. Demgegenüber ist zu bemerken, daß alle Autoren im allgemeinen zugeben, daß die Elemente des Milchfettes kugelrund sind.

Es bleibt nun nur die Möglichkeit eines Fehlers in der Messung, und es ist wahrscheinlich, daß dieser Fehler, wenn nicht der einzige, doch der hauptsächlichste ist. Einerseits würde derselbe kleiner sein, wenn man eine größere Zahl Kügelchen messen wollte.

Noch ein anderes Mittel gäbe es, d. h. wenn man die Messung bei einer stärkeren Vergrößerung vornehmen würde. In der Praxis wäre es hinlänglich, wenn man sich eines stärkeren Objektivs und desselben Okular-Mikrometers bediente, weil dadurch das Bild des Kügelchens größer erscheinen und die Dimensionen des Maßstabes des Okular-Mikrometers unverändert bleiben würden; das Bild des Kügelchens würde eine größere Zahl von Divisionen bedecken; wenn man dann annimmt, daß mit einem schwächeren Objektiv der Fehler einer halben Division einem wirklichen Fehler eines

Mikromillimeters entspricht, müßte bei doppelter Vergrößerung dieser Fehler nötigerweise einem halben Mikromillimeter entsprechen.

Schluß.

Obwohl die von mir vorgeschlagene Methode sich in Hinsicht auf Genauigkeit mit derjenigen Soxhlets nicht messen kann, so ist sie dennoch genauer als die bisher gebrauchten klinischen Verfahren; und sie könnte auch durch weitere Modifikationen noch sehr vervollkommnet werden.

Andererseits sind Einfachheit des Verfahrens und Kürze der Berechnung nach der besprochenen, von mir vorgeschlagenen Formel (s. Technisches Verfahren) Eigenschaften, welche die nötigen Bedingungen für eine gute, klinische Methode bilden.

Zur Kenntnis der Raffinose.
Abbau der Raffinose zu Rohrzucker und d-Galaktose[1]).

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Institutes der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Februar 1907.)

Von den natürlich vorkommenden sogenannten höheren Zuckerarten besitzt die Raffinose besonderes Interesse, denn einmal ist sie der einzige in der Natur in nennenswerter Menge vorkommende Vertreter der Trisacharide und dann ist sie als ein ständiger und im Raffinationsbetriebe lästiger Begleiter des Rohrzuckers auch von erheblicher technischer Bedeutung.

Seit der ersten Untersuchung durch Berthelot[2]) sind die Ansichten über die Zusammensetzung und den Bau der Raffinose erheblichem Wechsel unterworfen gewesen. Tollens und Rischbieth[3]) gebührt das Verdienst, gezeigt zu haben, daß eine ganze Reihe von bis dahin für verschieden gehaltenen Zuckern — wie die Melitose, die Gossypose, der Pluszucker, zahlreiche aus Pflanzensamen isolierte Kohlehydrate sowie die im Rübensaft von Loiseau[4]) bei der Raffination aufgefundene und Raffinose benannte Substanz — identisch sind.

---

[1]) Vorgetragen in der Sitzung der deutsch. chem. Ges. zu Berlin am 26. November 1906.

[2]) Ann. de chimie (III) **46**, 66.

[3]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **18**, 2611. 1885.

[4]) Comptes rendus **82**, 1058.

Loiseau[1]) hat zuerst die Zusammensetzung der kristallisierten Raffinose richtig erkannt und gezeigt, daß sie der Formel $C_{18}H_{32}O_{16}$ $+ 5\,H_2O$ entspricht, eine Formulierung, die auch die richtige Molekulargröße der Raffinose wiedergibt. Schon frühzeitig ist das Drehungsvermögen der Raffinose beobachtet, das nach den zuverlässigsten Angaben $+ 104{,}0^0$ bis $+ 105{,}7^0$ beträgt. Die Raffinose gehört zu den an sich nicht reduzierenden Zuckerarten, erlangt aber durch Hydrolyse energisches Reduktionsvermögen. Die Natur der bei der Spaltung der Raffinose entstehenden einfachen Zucker haben Tollens und Rieschbieth[2]), sowie Tollens und Gans[3]) richtig erkannt. Die genannten Autoren zeigten, daß bei der Behandlung mit Säuren die Raffinose nach der Gleichung: $C_{18}H_{32}O_{16}$ $+ 2\,H_2O = 3\,C_6H_{12}O_6$ in drei Monosacharide zerfällt, die sich als d-Glukose, d-Fruktose und d-Galaktose erwiesen.

Scheibler und Mittelmeier[4]) machten sodann die wichtige Entdeckung, daß sich diese Spaltung der Raffinose in zwei deutlich getrennten Phasen vollzieht. Zunächst wird von dem Trisacharid allein die Fruktose losgelöst und es resultiert ein neues Disacharid, das in Anlehnung an die früher für Raffinose gebräuchliche Bezeichnung Melitriose den Namen Melibiose erhielt.

$$C_{18}H_{32}O_{14} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_{12}H_{22}O_{11}.$$

Die weiteren Arbeiten über die Natur dieser Melibiose, die auch für die Kenntnis der Raffinose von hervorragender Bedeutung sind, haben ergeben, daß die Melibiose zu den reduzierenden Disachariden gehört. Es erwies sich die Melibiose als ein Isomeres des Milchzuckers. Beide Kohlehydrate enthalten die Komponenten d-Glukose und d-Galaktose in ähnlicher Bindung, insofern, als in beiden Fällen der Traubenzuckerrest Träger der im Disacharid manifesten Aldehydgruppe ist, d. h. der Melibiose muß die Formel:

---

1) La sucrerie indigène et coloniale **28**, 96.

2) Ann. de chimie **82**, 169.

3) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **21**, 2150. 1888.

4) Ber. der deutsch. chem. Gesellsch. **22**, 1678. 1889; sowie **26**, 2930. 1893.

```
     CH ----           CHO
  /  |                  |
 /  HCOH               HCOH
O    |                  |
\   OHCH        O      OHCH
 \   |           \      |
  \- CH           \    HCOH
     |             \    |
    HCOH            \  HCOH
     |                  |
    CH2OH           -- CH2
(Galaktoserest.)  (Glukoserest.)
```

oder eine ähnliche zukommen[1]).

Da nun die Raffinose keine reduzierenden Eigenschaften mehr besitzt, muß der Fruktoserest derartig in die Melibiose eingeführt sein, daß sowohl die Karbonylgruppe des Fruchtzuckers wie die Aldehydgruppe der Melibiose verschwunden sind. In welcher Weise die Bindung hier statthat, ist bisher unentschieden, nur Vermutungen konnten hierüber geäußert werden. Es ist nun klar, daß man für die Beurteilung der Bindungsweise zwischen Fruktose und Melibiose einen wertvollen Anhalt gewinnen würde, falls es gelänge, die Spaltung der Raffinose so zu leiten, daß der Fruchtzucker mit einem der beiden anderen Monosacharide vereinigt als Disacharid zurückbliebe und statt dessen etwa d-Glukose oder d-Galaktose als freies Monosacharid aufträte.

Es liegt ein außerordentlich reichhaltiges Material über die Spaltung der Raffinose vor. Übereinstimmend geht aus diesem hervor, daß die hydrolysierenden Agentien rein chemischer Natur (anorganische oder organische Säuren, saure oder in wässriger Lösung stark dissociierte Salze) ausnahmslos derart reagieren, daß bei gemäßigter, kurzdauernder Einwirkung zunächst Fruktose und Melibiose gebildet wird, bei stärkerer Einwirkung infolge des Zerfalls der Melibiose Fruktose, Galaktose und Glukose entstehen.

Es hängt dies Verhalten offenbar mit dem Umstande zusammen, daß die Art der Bindung vom Fruktoserest an die Melibiose ganz anders ist als die Verknüpfung zwischen Glukose und Ga-

---

[1]) Unter Zugrundelegung des von Emil Fischer für die Disacharide aufgestellten Glukosidsymbols. Selbstverständlich sind verschiedene andere Formeln als die obige mit anderen Anhydridbildungen denkbar und vorläufig gleichberechtigt.

laktose in dem Melibiosekomplex und daß die Bindung der ersten Art leichter gelöst wird als die letztere.

Es war daher aussichtslos, auf rein chemischem Wege eine neue Art der Spaltung von Raffinose zu bewirken, nur ein spezifischer Katalysator, ein Enzym, konnte, wenn überhaupt, die Lösung der erwähnten Aufgabe ermöglichen.

Über die Spaltung der Raffinose durch Fermente ist bisher folgendes bekannt:

Die Enzyme der Oberhefe[1]) spalten die Raffinose ähnlich den verdünnten Säuren in Fruchtzucker und Melibiose und vergären, wenn lebende Hefe verwandt wird, nur das als Fruchtzucker vorhande Drittel des Trisacharides, die Melibiose ist gegen Oberhefen resistent.

Die Unterhefen[2]) vom Frohberger und Saazer-Typus hydrolysieren die Raffinose und vergären sie, wenn auch langsam, so doch vollständig. Dieses Verhalten hängt mit dem Gehalt der Unterhefen an einem zweiten Enzym, der Raffinomelibiase, zusammen, d. h. es rührt von dem Vorhandensein eines Fermentes her, das auch die Melibiose hydrolysiert. Die entstehenden Spaltungsprodukte Galaktose und Traubenzucker unterliegen im Gegensatz zur ungespaltenen Melibiose sodann der Vergärung durch die Zymase.

Prinzipiell gleich den Hefen verhalten sich verschiedene Sproß- und Schimmelpilze sowie Bakterien, d. h. auch sie hydrolysieren die Raffinose teils zu Fruchtzucker und Melibiose, teils vollständig zu den drei Monosachariden; dabei werden häufig die entstehenden Zuckerarten partiell (zu Oxalsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure usw.) umgewandelt oder vollständig oxydiert[3]).

Die den höheren Pflanzen entstammende Diastase[4]) ist ohne Wirkung auf die Raffinose, und ebenso verhalten sich zahlreiche

---

[1]) Siehe hierüber die eingehenden Untersuchungen von Bau. Chemiker-Ztg. **18**, 1794; Österreichisch-ungarische Ztschr. f. Zuckerindustrie und Landwirtschaft **30**, 205.

[2]) Loiseau, Comptes rendus **109**, 614, sowie Scheibler und Mittelmeier, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **22**, 3118, 1889.

[3]) Siehe bei von Lippmann, Chemie der Zuckerarten, 3. Aufl. **2**, 1645 und 1646. 1904.

[4]) Bau a. a. O.

Enzyme des Tierkörpers, wie E. Fischer und Niebel[1]), sowie Vogel und Pautz[2]) festgestellt haben.

Also auch bei der Spaltung der Raffinose durch Fermente oder lebende Organismen ist bisher keine im Effekt anderer Art der Hydrolyse als durch die rein chemischen Agentien bekannt geworden.

Die Überzeugung, daß ein die Raffinose in anderer Richtung zerlegendes Enzym in der Natur vorhanden sei, hat sich schließlich als zutreffend erwiesen, und nach einer großen Reihe vergeblicher Versuche fand sich im Emulsin das geeignete Agens.

Seit sehr langer Zeit ist das Emulsin als typisch glukosidspaltendes Ferment bekannt und in hunderten von Fällen geprüft. Sein Verhalten zu den Polysachariden, die ja in vieler Hinsicht Ähnlichkeit mit den Glukosiden zeigen, scheint jedoch weniger untersucht zu sein, denn die Spaltbarkeit der Raffinose durch dieses Ferment wäre wohl keinem aufmerksamen Beobachter entgangen.

Läßt man gereinigtes Emulsin auf eine etwa 10%ige wässerige Raffinoselösung einwirken, so findet man schon nach einigen Stunden, daß die vorher nicht reduzierende Flüssigkeit Fehlingsche Lösung reduziert. Das Maximum des Reduktionsvermögens stellt sich jedoch erst nach einigen Tagen ein, ein Verhalten, das auch sonst wiederholt bei der Spaltung von einfachen Glukosiden durch Emulsin beobachtet ist[3]). Verfolgt man den Verlauf der enzymatischen Spaltung polarimetrisch, so beobachtet man eine Drehungsverminderung, allein es zeigte sich sehr bald, daß die optische Untersuchung keinen sicheren Schluß zuläßt, da aus den Proteinsubstanzen des angewendeten Emulsinpräparats stets erhebliche Mengen linksdrehender Körper in Lösung gehen, die das polarimetrische Bild entstellen. Durch Bestimmung des Reduktionsvermögens kann man jedoch den Fortgang der Hydrolyse kontrollieren und findet, daß höchstens ein Drittel der in der

---

[1]) Sitzungsber. d. Königl. Preuß. Akademie d. Wissensch. Berlin **1896**, 73.

[2]) Ztschr. f. Biologie **32**, 304.

[3]) Z. B. beim Coniferin von F. Tiemann. Ber. d. dtsch. chem. Ges. **18**, 1599. 1885; bei gepaarten Glukuronsäuren von Neuberg und Neimann (Ztschr. f. physiol. Chemie **44**, 116, 1905.

Raffinose enthaltenen Monosacharide als reduzierender Zucker auf tritt. Dieser reduzierende Anteil erwies sich als d-Galaktose, neben der kein anderes Monosacharid vorhanden ist. Damit war der Beweis geliefert, daß Emulsin die Raffinose in der erwarteten Art zerlegt und daß bei dieser Spaltung d-Galaktose und ein nicht reduzierendes Disacharid entsteht, das Fruktose enthält.

So verhältnismäßig leicht es war, die Natur des reduzierenden Spaltungsproduktes (d-Galaktose) durch Überführung in das charakteristische und unlösliche d-Galaktose-Methylphenylhydrazon festzustellen, so bedeutende Schwierigkeiten bereitete die Indentifizierung des bei der Emulsinhydrolyse als zweites Produkt entstehenden nicht reduzierenden Disacharides. Das hängt damit zusammen, daß wir für die Isolierung der Monosacharide ausgezeichnete Methoden (Hydrazon-, Osazonbildung etc.) besitzen, für die sichere Erkennung der nicht reduzierenden Disacharide aber auf die Reindarstellung dieser Kohlehydrate angewiesen sind.

Das bei der Hydrolyse von Raffinose durch Emulsin neben Galaktose auftretende Disacharid muß aus d-Glukose und d-Fruktose sich zusammenfügen, d. h. es mußte, da es nicht reduzierte, Rohrzucker oder ein Isomeres sein. Seine Isolierung geschah folgendermaßen: Zunächst wurde das Reaktionsprodukt eingedampft, von der sich dabei ausscheidenden Eiweißmasse abfiltriert und mit mehr als der für 1 Molekül Monosacharid berechneten Menge Methylphenylhydrazin versetzt. Binnen kurzem krystallisiert das in Wasser unlösliche d-Galaktose-Methylphenylhydrazon aus, die Mutterlauge wird durch Ausäthern von überschüssigem Methylphenylhydrazin befreit und stellt nach dem Entfärben mit Knochenkohle eine farblose Flüssigkeit vor, deren Reduktionsvermögen minimal ist, nicht stärker, als dem geringen, in Lösung gebliebenen Anteil des Galaktose-Methylphenylhydrazons entspricht. Beim Eindampfen dieser Lösung hinterblieb ein typischer Zuckersyrup, der jedoch auch bei monatelangem Stehen nicht krystallisierte. Das kann nicht wundernehmen, wenn man bedenkt, daß bei dem erwähnten Verfahren geradezu eine Melassebildung im kleinen statthat; aus dem angewandten Emulsin gehen Eiweiß und wahrscheinlich dessen Spaltungsprodukte in Lösung. Die Zerlegung der Raffinose bleibt, wie fast jeder Fermentprozeß, unvollständig, der Syrup enthält also noch ungespaltenes Trisacharid, und schließlich sind kleine Mengen von Hydrazinverbindungen

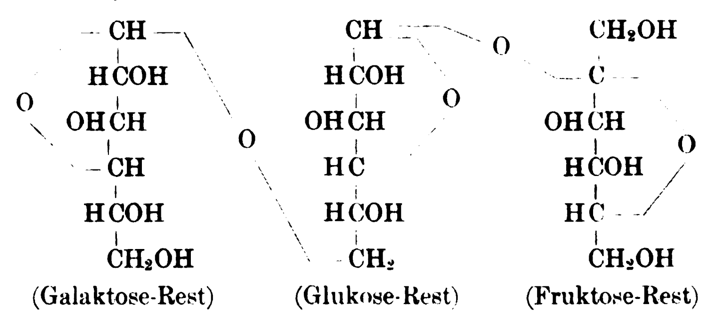
zugegen. Unveränderte Raffinose kann man dem Syrup durch Auskochen mit heißem Methylalkohol entziehen, und der hinterbliebene Rückstand zeigt nunmehr folgende Eigenschaften: Er schmeckt intensiv süß, reduziert nicht, dreht die Ebene des polarisierten Lichts nach rechts, nach dem Kochen mit Säuren (Inversion) aber links, wird durch Invertin gespalten, durch Hefe völlig vergoren und gibt eine außerordentlich starke Seliwanoffsche Reaktion. Da alle Krystallisationsversuche scheiterten, wurde das in der Flüssigkeit unzweifelhaft vorhandene Disacharid zunächst durch Fällung mit Phosphorwolframsäure von noch in Lösung befindlichen, dem Emulsin entstammenden stickstoffhaltigen Produkten sowie von den der Abscheidung entgangenen kleinen Resten d-Galaktose-Methylphenylhydrazon befreit. Durch sofortiges Eintropfen in Barytwasser entfernt man den Überschuß an Phosphorwolframsäure. Nimmt man die Behandlung mit Phosphorwolframsäure in der Kälte vor und filtriert nach dem Absitzen der Phosphorwolframate sofort ab, so wird das vorhandene Disacharid nicht angegriffen, da die Phosphorwolframsäure so schwach ist, daß sie in der Kälte keine Hydrolyse bewirkt.

Das Disacharid, welches sich in der durch Baryt von Phosphorsäurewolframsäure befreiten Lösung befindet, kann dann analog der in der Technik üblichen Methodik in eine feste Barytverbindung übergeführt werden; diese wird nunmehr mit Kohlensäure und etwas Ammoniumkarbonat zerlegt und eingeengt. Der resultierende Syrup wurde schließlich in heißem Alkohol von 98 % gelöst, der beim freiwilligen Verdunsten eine dicke Kristallmasse lieferte. Durch Verreiben mit 90%igem Alkohol wurde diese von der anhaftenden Mutterlauge befreit, und das hinterbleibende Kristallpulver kristallisierte sodann aus verdünntem Alkohol und lieferte eine Substanz, die sich in allen Stücken als mit Rohrzucker identisch erwies.

Durch diese Spaltung der Raffinose in Rohrzucker und d-Galaktose ist zum erstenmal ein sicherer Anhalt für die Bindungsweise des Fruktoserestes in diesem Trisacharid gewonnen. Auf Grund der schon lange bekannten Spaltbarkeit der Raffinose durch Invertin hatte man hier bereits früher eine Verknüpfung der Fruktose ähnlich wie im Rohrzucker angenommen. Jedoch war dieser Schluß recht unsicher, wenn man bedenkt, daß keinerlei Garantie

für die Einheitlichkeit des Invertins besteht und überdies nach dem heutigen Stande unseres Wissens dasselbe Enzym auch auf sicher verschieden gebaute Substrate wirken kann (vergl. die Spaltbarkeit von β-Methylglukosid und β-Methylgalaktosid einerseits und die sowohl der Phenolglukuronsäure wie des Koniferins als auch des Milchzuckers anderseits durch Emulsin). Erst durch die Isolierung des Rohrzuckers in Substanz ist nunmehr das Vorhandensein eines Sacharosekomplexes in der Raffinose sicher bewiesen.

Da Emulsin nach E. Fischer geradezu ein Reagens auf β-Glukoside ist, kann die Raffinose als β-Galaktosid des Rohrzuckers oder auch als Fruktosid der Melibiose bezeichnet werden, je nachdem man sie von der Sacharose oder der Melibiose ableiten will. Damit ist auch die Formel der Raffinose etwa durch das Symbol (oder durch ein ähnliches)



festgelegt bis auf die Unsicherheit, die noch in der Konstitution des Rohrzuckers oder der Melibiose besteht, d. h. bis auf die Art der Anhydridbildung zwischen den Hydroxylgruppen der einzelnen Monosacharide.

Durch die Überführung der Raffinose in Rohrzucker ist auch zum ersten Mal die Sacharose mit Sicherheit als Spaltungsprodukt einer natürlich vorkommenden höheren Zuckerart erhalten worden. Diese Umwandlung darf wohl auch ein gewisses pflanzenphysiologisches Interesse beanspruchen, da sie auf die Entstehungsart der in Betracht kommenden Polysacharide in der Natur ein Licht wirft.

Es ist bekannt, daß die Raffinose an ihrem Hauptfundorte, der Zuckerrübe, in sehr wechselnden Mengen vorkommt; bisweilen begleitet sie den Rohrzucker in nur minimalen Quantitäten, während sie in manchen Jahren in solchen Massen vorhanden ist,

daß sie sich in der Melasse bis zu einem Gehalt von 16 bis 22 % anreichert und dabei sogar von selbst auskristallisiert. Eine genaue Beobachtung dieser Verhältnisse hat ergeben, daß wahrscheinlisch geologische und klimatische Einflüsse der Grund für eine vermehrte Raffinosebildung in der Rübe sind (A. Herzfeld, E. O. v. Lippmann). Besonders bei Vegetationsstörungen, z. B. nach plötzlichem Eintritt von Frost, kann man oft einen abnormen hohen Raffinosegehalt konstatieren. Man kann sich vorstellen, daß unter diesen Bedingungen eine ungewöhnliche Hydrolyse der Galaktane und Galaktosegruppen enthaltenden Pektinstoffe [1]) stattfindet und daß durch anomale fermentative Prozesse die freigewordene Galaktose mit der Sacharose zu Raffinose zusammentritt. Es wäre demnach die vermehrte Raffinosebildung bis zu einem gewissen Grade ein pathologischer Prozeß in der Rübe, vergleichbar den Stoffwechselstörungen beim Tier.

Diese Hypothese findet angesichts des reversiblen Charakters der Enzymreaktionen durch die beobachtete Emulsinspaltung der Raffinose in die Komponenten Rohrzucker und d-Galaktose die erste experimentelle Begründung.

Nunmehr scheinen auch Versuche zu einer Synthese des Trisacharids auf der angegebenen Grundlage nicht mehr aussichtslos, sowohl rein chemische wie solche mit Hilfe der Enzyme, wie sie bei den Disachariden bereits mehrfach in den Händen E. Fischers [2]) und seiner Mitarbeiter zum Ziele geführt haben (vgl. auch A. Croft Hill [3]), E. Armstrong [4]), O. Emmerling [5]). Vielleicht wird auch die von C. Neuberg und H. Beitzke [6]) aufgefundene und von H. Hildebrandt bestätigte synthesenbefördernde [7]) Wirkung des immunisatorisch erzeugten Antiemulsins für einen künstlichen Aufbau der Raffinose herangezogen werden können.

---

[1]) Die Fermenthydrolyse dieser Stoffe soll im Hinblick auf diese Theorie studiert werden.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **35**, 3144. 1902.

[3]) Proceed. of the royal society **76**, 592. 1906.

[4]) Journ. of chemical society **73**, 634. 1898.

[5]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **34**, 600, 2206. 1901.

[6]) Verhandl. d. deutsch. patholog. Ges. 8. Tagung **1904**, 160.

[7]) C. Neuberg und H. Beitzke, Virchows Arch. **183**, 169. 1905. H. Hildebrandt ebenda **184**, 325. 1906.

Es ist reizvoll, eine ähnliche Untersuchung über die mögliche Herausschälung eines Sacharosekernes auch auf die natürlichen Isomeren und Homologen der Raffinose auszudehnen. In der Tat konnte bereits festgestellt werden, daß der seltene Zucker Stachyose, der ein nicht reduzierendes Tetrasacharid der Formel $C_{24}H_{42}O_{21}$ ist und bei der vollkommenen Hydrolyse in 2 Moleküle Galaktose, 1 Molekül Fruchtzucker und 1 Molekül Glukose zerfällt, durch Emulsin zerlegt wird; doch stand bisher für eine genaue Charakterisierung der fermentativen Spaltungsprodukte nicht hinreichend reines Material zur Verfügung.

Schließlich sei noch erwähnt, daß ein anderes wie Emulsin auf Raffinose wirkendes Ferment bisher nicht sicher nachgewiesen werden konnte. Die dem Emulsin in mancher Hinsicht vergleichbare Kefirlaktase[1]) zerlegt zwar Raffinose, aber so wie die Raffinomelibiasen unter Fruktoseabspaltung, und ebenso verhält sich das Enzymgemisch von Aspergillus niger. Die Zerlegung von Raffinose in d-Galaktose und Rohrzucker ist also eine recht charakteristische Emulsinwirkung, auf die sich auch eine sehr scharfe Methode der Erkennung kleinster Raffinosemengen gründen läßt (siehe darüber S. 535).

Nicht zum mindesten von technischen Gesichtspunkten aus ist die Überführung der Raffinose in Rohrzucker ein beachtenswerter Vorgang, da er geeignet erscheint, der Zuckerindustrie für die augenblicklich im Vordergrunde des Interesses stehende Raffinosefrage einen Weg der Lösung zu zeigen.

Wie schon erwähnt, steigt in manchen Jahren die Menge der Raffinose in der Rübe so erheblich, daß es sich in bestimmten Stadien des Raffinationsbetriebes (Melasse) bis zu 20 und mehr Prozent anhäuft. Die hauptsächlichste und gewinnbringendste Verwertung der Melasse als Speisesyrup wird hierdurch aber nicht

[1]) Die Spaltbarkeit von Raffinose durch Kefirlaktase ist bereits früher untersucht, doch widersprechen sich die Angaben der Autoren [vgl. Schnurmanns Steckhofen (Kochs Jahresberichte über Gärungsorganismus **1891**, 136) und Beyerinck (Centralbl. für Bakteriologie und Bakterienkunde **6**, 44)]. Die Raffinose wird von einem wässerigen Auszug der käuflichen Kefirkörner schon nach einigen Stunden stark zerlegt. Dabei tritt zunächst von den Monosachariden allein Fruktose auf; ob bei fortgesetzter Einwirkung auch die anderen Sechskohlenstoffzucker im freien Zustande erscheinen, ist nicht untersucht.

unerheblich erschwert; denn durch das meist erfolgende Auskristallisieren von fester Raffinose bleibt er nicht „blank" und wird unansehnlich. Durch Behandlung mit Emulsin läßt sich die Raffinose der Melasse in Rohrzucker überführen, wodurch eine Trübung der Syrupe durch nachträgliche Kristallisation ausgeschlossen wird. Die Überführung in Rohrzucker gewährt aber noch einen anderen Vorteil; während die Raffinose nur eine minimale Süßkraft besitzt, kommt bei der angegebenen Spaltung das hohe Süßungsvermögen ihrer Rohrzuckergruppe voll zur Geltung. Natürlich kann man in praxi statt des gereinigten Emulsins rohe, fein zerkleinerte Mandeln anwenden, die ja in die Melasse keine fremden Bestandteile hineinbringen, höchstens ihr einen angenehmen Geschmack und Geruch erteilen. Das Emulsinverfahren erlaubt also, die durch ungewöhnliche Vorgänge in der Rübe verursachten Verluste an Süßkraft durch Rückverwandlung der Raffinose in Rohrzucker wieder einzubringen.

Experimenteller Teil.

(Mitbearbeitet von stud. phil. F. Marx).

A. Spaltung der Raffinose durch Emulsin.

10 g reine Raffinose[1]) wurden in 100 ccm Wasser gelöst, nach dem Abkühlen mit 3 g festem Emulsin[2]) versetzt und unter Zusatz einiger Tropfen Toluol in einem verschlossenen Gefäß im Brutschrank bei 38° aufbewahrt. Die anfangs nicht reduzierende Flüssigkeit zeigt am nächsten Tage deutliches Reduktionsvermögen, dessen Stärke bei weiterem Verweilen im Brutschrank wächst. Gleichzeitig kann man eine deutliche Abnahme des Drehungsvermögens konstatieren, wie aus folgender Tabelle hervorgeht:

Drehung im 2-Dezimeterrohr in einem Prozente Traubenzucker angebenden Polarisationsapparat:

Anfangsdrehung	+ 9,4%
nach 2 Tagen	+ 8,5%
nach 6 Tagen	+ 6,8%
nach 12 Tagen	+ 5,0%

[1]) Den größten Teil der zu den folgenden Versuchen benutzten Raffinose, ein fast reines Präparat, verdanken wir der Güte des Herrn Direktors Siegert von der Zuckerraffinerie Hildesheim, dem auch an dieser Stelle dafür verbindlichst gedankt sei.

[2]) Über die event. Reinigung des Fermentes, siehe S. 538.

Allein diese Zahlen geben kein klares Bild der stattgefundenen Zerlegung, da sehr erhebliche Mengen Eiweiß und wohl auch optisch aktiver Spaltungsprodukte aus den Proteinsubstanzen des Emulsinpräparates in Lösung gehen. Daß überdies die Geschwindigkeit der Zerlegung von der Quantität wie von der Güte des benutzten Emulsins abhängt, zeigt die folgende Tabelle:

Drehung im 1-Dezimeterrohr an einem Prozente Traubenzucker anzeigenden Polarisationsapparat.

Anfangsdrehung	5,6 %
nach 2 Tagen	4,55 %
nach 4 Tagen	3,75 %
nach 6 Tagen	3,5 %
nach 8 Tagen	3,0 %
nach 11 Tagen	2,7 %
nach 20 Tagen	2,7 %.

Hier war gleichfalls eine Lösung von ungefähr 10 g Raffinose in ca. 100 ccm Wasser verwendet und mit einem Gramm eines anderen Emulsinpräparates behandelt.

Sicherer ist es daher, den Fortgang der Reaktion durch Bestimmung des Reduktionsvermögens zu verfolgen. Hierbei findet man folgendes (bei genauer Berücksichtigung des Volumens):

Verwendet wurde eine n/10 Raffinoselösung = 5,94 g Trisacharid ($C_{18}H_{32}O_{16} + 5\ H_2O$) in 100,0 ccm Wasser. Bei vollständiger Hydrolyse könnten entstehen 5,40 g Monosacharide, deren Reduktionsvermögen praktisch als gleich angenommen werden kann. Die erhaltenen Quantitäten Kupferoxydul entsprachen:

nach 2 Tagen	0,0286 g Hexose = 5,3 %	der möglichen Menge Monosacharide.
nach 4 Tagen	0,0474 g Hexose = 8,8 %	
nach 8 Tagen	0,0975 g Hexose = 13,1 %	
nach 16 Tagen	0,1560 g Hexose = 29,0 %	

Es wird also je nach der Wirksamkeit des angewandten Emulsins in kürzerer oder längerer Zeit ein Endzustand erreicht, in welchem die Abspaltung von höchstens einem Driitel der im Trisacharid vorhandenen 3 Monosacharide vollzogen ist.

Auch bei monatelanger Aufbewahrung im Brutschrank oder bei Zimmertemperatur steigt die Menge des abgespaltenen oder reduzierenden Zuckers nicht.

B. Isolierung der durch Emulsin aus Raffinose abgespaltenen d-Galaktose.

Eine Lösung von 10 g Raffinose in 100 g Wasser, die drei Wochen mit 3 g Emulsin behandelt war, wurde filtriert, dann auf dem Wasserbade eingeengt und nochmals von den flockig ausgeschiedenen Proteinsubstanzen abfiltriert. Des Filtrat wurde nunmehr mit dem gleichen Volumen Alkohol und 3 g Methylphenylhydrazin versetzt. Die zu dünnem Sirup eingeengte Flüssigkeit erstarrte bald zu einem Brei schwach gelb gefärbter Kristalle. Nach 24 Stunden wurden dieselben abgesaugt, erst mit kaltem Wasser und dann mit Alkohol ausgewaschen. Dabei hinterblieb eine farblose Kristallmasse, die zur Reinigung aus viel heißem Wasser umkristallisiert wurde. Die Verbindung scheidet sich in prismatischen Säulen aus, die den Schmelzpunkt 191° und die Zusammensetzung eines Hexosemethylphenylhydrazons besitzen:

0,2034 g angewandte Substanz ergaben 17,0 ccm feuchten Stickstoff bei 19° und 770 mm.

Ber. für $C_6H_{12}O_5 : N \cdot N(CH_3)(C_6H_5) = C_{13}H_{20}N_2O_5$:
$N = 9{,}88\,\%$.
Gef. $N = 9{,}86\,\%$.

Durch eine ungenaue Literaturangabe über den Schmelzpunkt von d-Galaktosemethylphenylhydrazon, nämlich 180°, wurden wir anfangs irregeführt, bis sich zeigte, daß aus reiner Galaktose dargestelltes Methylphenylhydrazon am selben Thermometer mit dem Produkt aus Raffinose ebenfalls bei 191° schmilzt und sich auch sonst diesem gleich verhält (übrigens schmilzt d-Glukosemethylphenylhydrazon, das im Gegensatz zum d-Galaktosemethylphenylhydrazon in Wasser und Alkohol leicht löslich ist, bei 130° und d-Fruktosemethylphenylhydrazon, das sich nur sehr schwer in festem Zustande abscheidet und sich spielend in Wasser und Alkohol löst, bei 116 bis 120°).

Die Ausbeute an reinem d-Galaktosemethylphenylhydrazon aus 10 g durch Emulsin gespaltener Raffinose schwankte in den verschiedenen Darstellungen, betrug aber bis 92% der Theorie, bei eventuell nochmaliger Spaltung der Mutterlauge (siehe S. 534). Um die Reinheit des d-Galaktosemethylphenylhydrazons auch auf anderem Wege zu beweisen, wurden schließlich 5,7 g desselben

nach dem Verfahren von O. Ruff und G. Ollendorf[1]) mittels Formaldehyd gespalten, wobei 3,45 g, d. h. fast die theoretische Ausbeute, an sofort kristallisierender d-Galaktose erhalten wurden.

Das aus Methylalkohol umkristallisierte Präparat schmolz bei 163°.

Die Analyse der im Vakuum bei 40° getrockneten Substanz zeigte die Reinheit der d-Galaktose.

0,1622 g Substanz lieferten 0,2375 g CO_2 und 0,0948 g H_2O.

Ber. für $C_6H_{12}O_6$: C = 40,00 %, H = 6,67 %

Gef. C = 40,11 %, H = 6,49 %.

Weder in den Mutterlaugen des rohen noch des unkristallisierten d-Galaktose-Methylphenylhydrazons konnte ein anderes Hydrazinderivat eines 6-Kohlenstoffzuckers oder Disacharides nachgewiesen werden, sodaß d-Galaktose mit Sicherheit die einzig reduzierende Zuckerart ist, die bei der Zerlegung der Raffinose durch Emulsin auftritt.

C. Isolierung des durch Emulsin aus Raffinose abgespaltenen Rohrzuckers.

Zur Gewinnung von Rohrzucker aus den Produkten der Hydrolyse von Raffinose durch Emulsin können zweckmäßig die Mutterlaugen des rohen d-Galaktose-Methylphenylhydrazons dienen.

Die vom d-Galaktose-Methylphenylhydrazon abgesaugte dicke Lösung samt der wässerigen Waschflüssigkeit wird im Scheidetrichter zur Entfernung der überschüssigen Hydrazinbase mit Äther ausgeschüttelt, solange sich der letztere färbt, und dann in der Siedehitze mit Knochenkohle behandelt. Es resultiert ein wasserklares Filtrat von nur ganz minimalem Reduktionsvermögen, welches auf Spuren in Lösung gebliebenen freien oder an d-Galaktose gebundenen Methylphenylhydrazins zu beziehen ist.

Ergibt eine Wägung des zuvor abgeschiedenen d-Galaktose-Methylphenylhydrazons (siehe oben), daß eine annähernd vollständige Spaltung der Raffinose stattgefunden hat, so kann die entfärbte Flüssigkeit direkt auf Rohrzucker verarbeitet werden. Zu diesem Zwecke wird sie auf dem Wasserbade zu dünnem Sirup

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 2334. 1899.

eingeengt und dann mit heißem Methylalkohol ausgezogen. Dieser nimmt kleine Mengen ungespaltener Raffinose auf, die sich nach C. Scheibler[1]) ca. 25 mal leichter als Rohrzucker in Holzgeist löst. Den restierenden, z. T. erhärtenden, aber nicht kristallisierenden Sirup löst man zu einer etwa 10%igen Lösung in destilliertem Wasser, kühlt ab, fällt ihn durch eine eiskalt gehaltene Lösung von Phosphorwolframsäure, filtriert sofort von dem sich schnell absetzenden Niederschlage ab und läßt das Filtrat in überschüssiges Barytwasser tropfen. Die vom phosphorwolframsauren Baryt befreite Lösung wird auf dem Wasserbade eingeengt, mit der etwa 20fachen Menge absoluten Alkohols und dann solange mit Barytwasser versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Derselbe wird nach einiger Zeit abgesaugt und gründlich mit einer Mischung gleicher Teile Barytwasser und Alkohol ausgewaschen, dann in Wasser suspendiert und mit Kohlensäure unter Zusatz von etwas Ammoniumkarbonat anfangs in der Kälte, später auf dem Wasserbade zerlegt. Die vom Baryumkarbonat abfiltrierte Zuckerlösung wird wieder auf dem Wasserbade eingeengt, in der gerade nötigen Menge heißen Alkohol gelöst, von den in der Kälte sich absetzenden geringen sirupösen Abscheidungen abgegossen und nunmehr der freiwilligen Verdunstung überlassen. Dabei hinterbleibt eine dicke Kristallmasse, die man nach einigen Tagen in einer Reibschale mit 90%igem Alkohol verreibt, dadurch von der anhängenden Mutterlauge befreit und nach dem Abfiltrieren aus heißem Alkohol umkristallisiert. Die so erhaltene Substanz ist Rohrzucker.

0,1468 g Substanz (im Vakuum getrocknet) ergaben 0,2274 g CO_2 und 0,0899 g H_2O.

Ber. für $C_{12}H_{22}O_{11}$: C = 42,11 %, H = 6,43 %

Gef. C = 41,77 %, H = 6,80 %.

0,4820 g Substanz in 10,0 ccm Wasser gelöst zeigten bei einem spezifischen Gewicht von 1,018 bei 16° eine Drehung von $+ 6^{\circ} 33' = + 6,55^{\circ}$; daraus ergibt sich $[\alpha]_{D\,16} = + 66,7^{\circ}$. Dieser Wert stimmt mit dem für reine Sacharose ausgezeichnet überein.

Außerdem wurde dieses aus Raffinose erhaltene Disacharid durch Inversion sowie durch alle in der Einleitung angegebenen Proben als Rohrzucker identifiziert.

---

[1]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **19**, 2872. 1886.

Ergibt die Wägung des d-Galaktose-Methylphenylhydrazons, daß die Hydrolyse der Raffinose durch Emulsin noch nicht angenähert vollständig ist, so muß man zur Darstellung des Rohrzuckers die ausgeätherte und entfärbte Flüssigkeit zuvor einer nochmaligen Spaltung durch das Ferment unterwerfen. Auch auf anderem Wege als durch Bestimmung der in Freiheit gesetzten Galaktose — sei es als Methylphenylhydrazon, sei es durch Bestimmung des Reduktionsvermögens — kann man sich leicht über die Höhe der Rohrzuckerbildung aus Raffinose orientieren. Denn die nach der Abscheidung der Galaktose (in Form des Methylphenylhydrazons) übrig bleibende rechtsdrehende Flüssigkeit muß nach dem Aufkochen mit Säuren Linksdrehung aufweisen infolge Bildung von Invertzucker $[\alpha]_D =$ ca. $- 20^0$); ist dagegen noch viel ungespaltene Raffinose vorhanden, so erzielt man durch Kochen mit Säuren keine Linksdrehung, sondern die Flüssigkeit bleibt dextrogyr, da die invertierte Raffinose ein Drehungsvermögen von ca. $+ 53,5^0$ zeigt.

Die Menge des in Substanz isolierten Rohrzuckers betrug im Durchschnitt aus mehreren gut gelungenen Versuchen ca. 50% der Theorie. Das kann angesichts der vielen mühevollen und verlustreichen Operationen nicht wundernehmen. Bestimmt man aber im Filtrat vom Galaktose-Methylphenylhydrazon die Menge der vorhandenen Sacharose polarimetrisch nach Clerget-Herzfeld, so findet man bei gutem Verlauf der enzymatischen Spaltung bis 80—90% der möglichen Quantität, d. h. eine bei einem fermentativen Prozeß durchaus befriedigende Menge.

Über den Nachweis kleiner Mengen von Raffinose.

Von

Carl Neuberg und **Fritz Marx.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Februar 1907.)

Es ist bisher kaum möglich, kleine Mengen von Raffinose nachzuweisen, namentlich dann nicht, wenn sich das Trisacharid in Spuren neben anderen Kohlehydraten vorfindet. E. O. von Lippmann schreibt über diesen Punkt in seinem bekannten Handbuche[1]: „Die zum qualitativen Nachweis der Raffinose angegebenen Verfahren sind sämtlich von nur bedingtem Werte“:

Nur wenn Raffinose in reinem Zustande vorliegt oder ihre Beimischung zu anderen Zuckerarten mehrere Prozent beträgt, können die Anhaltspunkte verwertet werden, die durch die polarimetrischen Daten vor und nach der Inversion, sowie durch das Vorhandensein der Galaktosegruppe (Schleimsäurebildung)[2] gegeben sind. Aber auch diese Kriterien versagen, wenn optischaktive Nichtzuckerstoffe sowie Pektinkörper[3] (wie z. B. in der Melasse) vorhanden sind. Befindet sich die Raffinose zu kleinerer Quantität in Gemischen mit reduzierenden Mono- und Disachariden, so ist überhaupt keine Methode des Nachweises bekannt.

Ein Verfahren zur Erkennung der Raffinose läßt sich nun auf die im voraufgehenden beschriebene Spaltbarkeit durch Emulsin

---

[1]) Chemie der Zuckerarten, 3. Aufl. **2**, 1650.

[2]) A. Herzfeld, Ztschr. d. Vereins d. deutsch. Zuckerindustrie **42**, 150.

[3]) A. Wohl u. von Niessen, Ztschr. d. Vereins d. deutsch. Zuckerindustrie **32**, 655 und 924.

gründen für alle die Fälle, in denen Raffinose neben nichtreduzierenden Zuckerarten vorhanden ist, namentlich für den praktisch bei weitem wichtigsten Fall des Nachweises von Rafinose im Rohrzucker. Wie zuvor beschrieben ist, zerfällt die Raffinose unter dem Einfluß des Emulsins in die reduzierende d-Galaktose und in nicht reduzierenden Rohrzucker. Nun ist schon lange bekannt, und wir haben uns von neuem wieder davon überzeugt, daß Rohrzucker gegen Emulsin absolut beständig ist, d. h. er wird auch bei längerer Berührung mit Emulsin nicht zu reduzierenden Zuckerarten invertiert. Daher zeigt das Auftreten einer Reduktion nach der Behandlung eines Rohrzucker-Raffinosegemisches mit Emulsin, die auf der Abspaltung von Galaktose beruht, mit großer Schärfe die Raffinose an.

Es war a priori durchaus nicht ausgeschlossen, daß die Hydrolyse von Raffinose durch Emulsin bei Gegenwart eines enormen Überschusses[1]) an Rohrzucker ausblieb. Der Versuch entschied jedoch erfreulicherweise in entgegengesetztem Sinne, indem die Emulsinwirkung auf Raffinose noch eintritt, wenn sich ein Teil des Trisacharides neben 100 bis 250 Teilen Rohrzucker findet.

A. Digeriert man 1,0 ccm einer wässerigen Lösung, die 10 g Rohrzucker und 0,1 g Raffinose in 100 ccm Wasser enthält, mit einer Messerspitze Emulsin unter Zusatz eines Tropfens Toluol 24 Stunden im Brutschrank bei 38°, so reduziert die vorher unwirksame Flüssigkeit Fehlingsche Lösung sehr deutlich, und nach 36 bis 48 Stunden ist der Ausfall der Reduktionsprobe noch viel stärker, d. h. es können 0,01 g Raffinose neben der hundertfachen Menge Rohrzucker erkannt werden.

B. Behandelt man in derselben Weise 1,0 ccm einer Lösung, die 0,04 g Raffinose und 10 g Rohrzucker in 100 ccm enthält, in gleicher Weise mit Emulsin, so ist nach 24stündigem Stehen im Brutschrank bei 38° die Reduktion von Fehlingscher Flüssigkeit schon nachweisbar, aber sie wird durch die Biuretreaktion häufig gestört, die von dem in Lösung gegangenen Eiweiß des Emulsins und dem Kupfersalz der Fehlingschen Lösung herrührt. Nach 48 Stunden jedoch ist auch hier die Reduktion ohne weiteres er-

[1]) Rohrzucker ist ja gerade ein Spaltungsprodukt der Raffinose durch Emulsin, und man kennt eine Anzahl von Fällen, wo die Produkte der fermentativen Hydrolyse die Zerlegung hemmen.

sichtlich, d. h. es kann ein Teil Raffinose neben der 250fachen Menge Sacharose nachgewiesen werden.

Für die praktischen Bedürfnisse der Zuckerindustrie ist es von Wichtigkeit, daß die Wirkung des Emulsins auch bei der schwach alkalischen Reaktion des technischen Rohrzuckers eintritt. Versetzt man die obige Zuckerlösung A mit Phenolphtalein und soviel n/10-Natronlauge, daß gerade eine Rötung eintritt, so verschwindet diese Rotfärbung beim Zusammenbringen des Emulsins mit der Lösung wegen der Bindung des Alkalis an das amphotere Eiweiß des Enzympräparates, und nach 24stündiger Digestion tritt Reduktion von Fehlingscher Lösung ein. Verwendet man soviel Zuckerlösung, daß ihr Alkali nicht von den Proteinsubstanzen des Emulsins gebunden wird, oder setzt man mehr n/10-Lauge hinzu, d. h. wenn in beiden Fällen die Flüssigkeiten auch nach dem Schütteln mit Emulsin noch gegen Phenolphtalein alkalisch reagieren, so tritt trotzdem Spaltung und Reduktionsvermögen auf. Immerhin empfiehlt es sich, alkalische Lösungen nach Möglichkeit zu vermeiden und vor der Einwirkung des Emulsins neutrale Reaktion gegen Phenolphtalein herzustellen.

Ließ sich also bis vor kurzem Raffinose durch kein bekanntes Reagens neben Rohrzucker nachweisen (v. Lippmann[1]), hat man jetzt in der Emulsinspaltung eine auch den praktischen Bedürfnissen genügende Methode zur qualitativen Bestimmung kleinster Raffinosemengen.

Bei Gegenwart reduzierender Zucker versagt natürlich auch das Emulsinverfahren, das sich ja auf das Auftreten gerade des Reduktionsvermögens gründet. Aber auch andere nicht reduzierende, durch Emulsin spaltbare Polysacharide dürfen nicht zugegen sein, wie eventuell die seltenen Isomeren der Raffinose oder die Stachyose (siehe S. 528). Allein das Vorkommen dieser Zuckerarten ist ein sehr seltenes und kann speziell für die Rübenzuckerpraxis nach den heutigen Kenntnissen als ausgeschlossen gelten. In anderen Fällen muß auch auf die Möglichkeit Rücksicht genommen werden, daß eigentliche Glukoside zugegen sind, die von Emulsin ja zum Teil ebenfalls hydrolysiert werden.

Um vor Trugschlüssen sicher zu sein, muß man für die analytischen Zwecke ein einwandfreies Emulsin verwenden; die

[1]) Chemie d. Zuckerarten, 3. Aufl., **2**, 1653.

käuflichen Präparate sind durchaus nicht immer tadellos; es kommen nämlich im Handel Emulsinsorten vor, die zwar an sich nicht oder nur minimal reduzieren, aber ohne besonderen Zusatz eines hydrolisierbaren Kohlehydrates allein bei der Digestion mit Wasser eine reduzierende Lösung geben; vielleicht rührt dieses Verhalten von einem geringen Gehalt an einem Glukoside her. Solche Präparate kann man in folgender Weise reinigen: Man schüttelt 10 g käufliches Emulsin mit 100 bis 200 ccm Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Toluol zwei Stunden auf der Maschine, läßt 24—36 Stunden stehen und filtriert nach dieser Zeit. Die klare Lösung versetzt man mit dem vierfachen Volumen absoluten Alkohols und sammelt die flockige Ausscheidung nach einer halben Stunde auf einem Filter und wäscht sie mit Alkohol und Äther aus. Reduzierende Begleiter des Emulsins bleiben im wässerigen Alkohol, während das so gereinigte Präparat weder an sich noch bei der Digestion mit Wasser reduzierend wirkt, aber gut spaltet und haltbar ist.

Will man jede Möglichkeit einer Täuschung ausschließen, so kann man auch folgende Kontrollproben anstellen: a) die Lösung der raffinosehaltigen Substanz mit Emulsin, b) eine Rohrzuckerlösung mit Emulsin, c) Emulsin mit Wasser, d) die Lösung der zu untersuchenden Substanz mit einer Emulsinsuspension in Wasser, die zuvor $^5/_4$ Stunden auf 100^0 erhitzt ist. Nachdem sämtliche Proben mit einem Tropfen Toluol versetzt sind, werden sie im verschlossenen Reagenzglase im Brutschrank 24 bis 48 Stunden belassen: nur a) darf dann Fehlingsche Lösung reduzieren.

Ein einmal geprüftes Emulsinpräparat, das lange Zeit wirksam und einwandfrei bleibt, kann man jedoch ebenfalls anstandslos verwenden.

Untersucht man mit diesem Verfahren den Rohrzucker des Handels, so findet man ihn in der Mehrzahl der Fälle frei von Raffinose; einige Male jedoch war Trisacharid nachweisbar.

Reduktionen in der Zuckerreihe mittels metallischen Calciums.

Von

Carl Neuberg und **Fritz Marx.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Februar 1907.)

Bei dem synthetischen Ausbau der Zuckergruppe haben die Reduktionen einerseits der Säurelaktone zu den Aldosen, andererseits die der letzteren wie der Ketosen zu den entsprechenden Alkoholen eine bedeutende Rolle gespielt. Diese Reduktionen sind seinerzeit von E. Fischer mit Natriumamalgam ausgeführt und haben die zwar siegreich überwundenen, aber immerhin vorhandenen Schwierigkeiten mit sich gebracht, denen man sich meist gegenüber sieht, wenn es gilt, anorganische Natriumsalze von Substanzen aus der Kohlehydratgruppe zu trennen. Es war zu erwarten, daß man diese Schwierigkeiten wesentlich würde verringern bezw. umgehen können, wenn man an Stelle des Natriums das jetzt leicht erhältliche metallische Calcium [1]) anwenden würde.

Im folgenden sei die Darstellung mittels Calciums von teilweise schon bekannten Substanzen sowie die des noch unbekannten Reduktionsprodukts des Milchzuckers, das Laktobiotit genannt sei, beschrieben.

---

[1]) Dasselbe wird z. B. von den Elektrochemischen Werken Bitterfeld zu billigem Preis in den Handel gebracht und zwar in Stangen- wie in Griesform. Den größten Teil des zu den folgenden Versuchen benützten metallischen Calciums verdanken wir der Liberalität der genannten Fabrik, der wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Während man Natrium bei der Heftigkeit, mit der es reagiert, auf wässerige Lösungen nur in Form seines Amalgams einwirken lassen darf, kann man das sehr viel träger wirkende Calcium[1]) in manchen Fällen ohne weiteres anwenden. Hierfür fanden wir grobe Drehspäne, die aus dem Stangencalcium auf der Drehbank hergestellt wurden, recht geeignet. Für die Bereitung von Calciumamalgam kann zweckmäßig der käufliche feine Calciumgries dienen. Für die Darstellung von Calciumamalgam gaben Moissan und Chavanne[2]) eine Vorschrift an, deren Ausführung insofern lästig ist, als bei ihr das Calcium mit dem Quecksilber geschüttelt werden muß. Bei der starken Selbsterwärmung während der Amalgamierung tritt fast stets ein Springen der Glasgefäße ein; außerdem ist bei der Darstellung größerer Mengen von Calciumamalgam auch die mechanische Schüttelung des schweren Quecksilbers mit den gewöhnlichen Laborationsmitteln keine Annehmlichkeit. Leicht kann man nun im offenen Gefäß ohne Schüttelung in einer Operation größere Mengen Calciumamalgam darstellen, wenn man eine geräumige Reibschale aus dickem Porzellan langsam in einem Trockenschrank auf ca. 100° anwärmt, sie nun mit der nötigen Menge Quecksilber füllt, darnach etwas Calcium einträgt und mit einem gleichfalls angewärmten Pistill verreibt. Dabei tritt die Amalgambildung fast sofort ein und schreitet, wenn sie einmal eingeleitet ist, durch die Selbsterwärmung auch beim Eintragen der Hauptmenge schnell fort. Verwendet wurde ein ungefähr 3%iges Amalgam.

Das sowohl bei Benutzung von Calciumdrehspänen wie von Calciumamalgam sich bildende Calciumhydroxyd kann dann je nach den gewünschten Reaktionsverhältnissen durch gleichzeitiges Einleiten von Kohlendioxyd oder nach Beendigung der Reduktion durch Oxalsäure, Ammoniumkarbonat usw. quantitativ entfernt werden.

Die Vorteile, die hierdurch gewährt werden, sind leicht ersichtlich.

---

[1]) Hinsichtlich der Verwendbarkeit des metallischen Calciums zu Reduktionen widersprechen sich die bisherigen Angaben. E. Beckmann [Berichte **38**, 904. 1905] konnte mit seiner Hilfe verschiedene Reduktionen in der aromatischen und hydroaromatischen Reihe mit Erfolg ausführen, während B. Setlik [Chem. Ztg. **29**, 218. 1905] in einer gleichzeitig erschienenen Arbeit zu dem entgegengesetzten Ergebnis gelangte.

[2]) Comptes rendus **140**, 125. 1905.

A. Reduktion von d-Glukose zu d-Sorbit.

5 g reiner Traubenzucker wurden in 200 ccm Wasser gelöst und unter heftigem Turbinieren in kleinen Mengen mit Calciumdrehspänen versetzt. Während der Prozedur wird dauernd ein lebhafter Strom von Kohlensäure durch die zu reduzierende Flüssigkeit geleitet, wodurch die Reaktion annähernd neutral gehalten wird. Die Reduktion ist beendet, wenn 25 bis 30 g Calcium verbraucht sind, wozu etwa 4—5 Stunden nötig sind. Das Eintragen des Calciums muß in solchem Tempo erfolgen, daß eine nennenswerte Erwärmung nicht stattfindet. Auf alle Fälle empfiehlt es sich, die Reduktionsflüssigkeit zu kühlen.

Sobald das Reaktionsgemisch Fehlingsche Lösung nicht oder kaum mehr reduziert, saugt man von dem aus Calciumkarbonat bestehenden Bodensatz[1]) ab, wäscht diesen mit heißem Wasser gut aus und dampft das Filtrat auf dem Wasserbade ein[2]). Dabei scheidet sich zumeist noch etwas Calciumkarbonat aus. Ohne von diesem abzufiltrieren, nimmt man den Rückstand in heißem 90%igen Alkohol auf, filtriert nunmehr und engt wiederum ein. Der entstandene Sorbit wird am einfachsten mittels Schwefelsäure und Benzaldehyd in die Dibenzalverbindung übergeführt und kann hieraus in bekannter Weise regeneriert werden.

B. Reduktion der d-Galaktose zu Dulcit.

5 g d-Galaktose wurden in 200 ccm Wasser gelöst und mit metallischem Calcium und Kohlendioxyd unter Turbinieren in der beim Traubenzucker angegebenen Weise behandelt. Die Reduktion vollzieht sich in ganz derselben Weise, nur daß der im Vergleich zum Sorbit sehr viel leichter kristallisierende Dulcit direkt kristallisiert erhalten werden kann. Zu diesem Zwecke wird das Filtrat vom Calciumkarbonat zum Sirup eingeengt, dieser mehrfach mit heißem Alkohol extrahiert, wobei sich nach Verdun-

---

[1]) Wenn die Flüssigkeit durch das abgeschiedene Calciumkarbonat dicklich wird, ist zu verdünnen, was zugleich auch das Turbinieren erleichtert.

[2]) Reagiert nach beendigter Reduktion die Lösung noch alkalisch, so muß das Einleiten von Kohlendioxyd bis zur neutralen Reaktion fortgesetzt werden. Das kann hier wie in den folgenden Fällen, wo die Reduktionsprodukte gegen Erdalkalien unempfindlich sind, durch Anwendung von Wärme beschleunigt werden.

stung der alkoholischen Auszüge der Dulcit direkt abscheidet. Die Ausbeute war in diesem Falle recht gut und betrug 4 g. Die Analyse ergab der Formel $C_6H_{14}O_6$ entsprechende Daten.

0,1256 g Substanz lieferten: 0,1831 CO_2 und 0,0900 H_2O.

Ber. für $C_6H_{14}O_6$: C = 39,88 %, H = 7,69 %

Gef. „ C = 39,73 %, H = 7,56 %.

C. Reduktion von d-Glukosoxim zu d-Glukamin.

5 g Glukosoxim wurden in 200 ccm Wasser gelöst und mit metallischem Calcium bis zum fast völligen Verschwinden der Reduktion gegen Fehlingsche Lösung unter Turbinieren und Kohlensäuredurchleiten behandelt; zur Beendigung der Reduktion sind etwa 35 g Calcium nötig. Das Filtrat von Calciumkarbonatschlamm wurde im Vakuum eingeengt und weiter nach Maquenne und Roux[1]) mit Calciumhydroxydbrei versetzt und dann mit heißem Alkohol extrahiert. Beim Verdunsten des Alkohols resultierte ein Sirup, der ohne weiteres nicht kristallisierte; er wurde deshalb durch Behandeln mit frisch gefälltem Cuprihydroxyd in die gleichfalls von Maquenne und Roux beschriebene Kupferverbindung $C_6H_{11}O_5NCu_2$ übergeführt, die aus heißem Wasser in schönen hellblauen Blättchen kristallisiert.

0,1382 g Substanz ergaben: 0,0725 g CuO (= 0,0580 g Cu).

0,1904 g Substanz verbrauchten (nach Kjeldahl) 6,6 ccm n/10 - H_2SO_4 (= 0,0092 g N).

Ber. für $C_6H_{11}O_5NCu_2$: Cu = 41,78 %, N = 4,61 %

Gef. „ Cu = 42,02 %, N = 4,82 %.

Zur weiteren Identifizierung wurde ein Teil des Glukaminkupfers mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die resultierende Lösung der freien Base mit der berechneten Menge Pikrinsäure versetzt; beim Einengen und Zusatz von Alkohol und etwas Äther scheidet sich dann das Glukaminpikrat, $C_6H_{15}NO_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$, in goldgelben Nadeln vom Schmelzpunkt 135 bis 136° ab.

0,1441 g Substanz ergaben 17,7 ccm N bei 14° und 749 mm.

Ber. für $C_{12}H_{18}N_4O_{12}$: N = 13,66 %

Gef. „ N = 14,02 %.

[1]) Comptes rendus **132**, 980. 1901; **134**, 291. 1902.

D. Reduktion von Milchzucker zu Laktobiotit.

Alkohole, die sich von den Disachariden ableiten, d. h. durch Reduktion aus ihnen entstehen, wie Sorbit aus Traubenzucker oder Mannit aus Mannose, sind bisher nicht oder kaum bekannt; weder von der Maltose noch von Milchzucker sind die entsprechenden Derivate beschrieben, nur einen bei der Reduktion von Melibiose $C_{12}H_{22}O_{11}$ entstehenden syrupösen Körper erwähnen C. Scheibler und H. Mittelmeier[1]) und betrachten ihn als Melibiotit.

Die Wirkung von naszierendem Wasserstoff auf die Disacharide mit Aldehydgruppen hat, soweit sie bisher überhaupt untersucht ist, meist zu einer Spaltung der Disacharide geführt. So isolierte Bouchardat[2]) bei der Einwirkung von Natriumamalgam auf Milchzucker Mannit, Dulcit, Hexylalkohol sowie Milchsäure, d. h. es war zu einer völligen Spaltung des Disacharides gekommen. Durch Anwendung von Calcium läßt sich die Reduktion des Milchzuckers nun so leiten, daß eine Sprengung der Disacharidbindung unterbleibt, allerdings vollzieht sich die Umwandlung der Laktobiose in den Laktobiotit außerordentlich viel langsamer und in geringerer Ausbeute als die Reduktion der Monosacharide. Da die Fixierung des Wasserstoffes eine sehr viel schlechtere ist, wird der Verbrauch an Calcium erheblich größer, und um den Wasserstoffverlust einzuschränken, ist in diesem Falle die Anwendung von Calicumamalgam geboten.

Die Ausführung der Reduktion gestaltet sich dann folgendermaßen: 5 g reiner Milchzucker wurden zunächst in 200 ccm Wasser gelöst und unter Durchleiten von Kohlendioxyd und gleichzeitigem Turbinieren mit kleinen Mengen Calciumamalgam versetzt. Die Menge des verbrauchten Amalgams schwankte bei den verschiedenen Versuchen, betrug aber einen großen Überschuß über die Theorie. Infolgedessen war es nötig, mehrfach von dem Quecksilber-Calciumkarbonatschlamm abzusaugen, bei neutraler Reaktion einzuengen und wieder von neuem zu reduzieren. Auf diese Weise dauert es in der Regel zwei bis drei Tage, bis das Reduktionsvermögen verschwunden war. Die schließlich resultierende Lösung des Laktobiotits enthält diesen neben einer Reihe von Verunreinigungen, namentlich solcher von saurem Charakter; offenbar ist es

---

[1]) Berichte. **22**, 3118. 1889.

[2]) Ann. de chimie et de physique (**4.** 27, 75).

während der langen Dauer des Prozesses zu einer Sacharin- und Isosacharinbildung unter dem Einfluß von Calciumhydroxyd oder Karbonat gekommen, die sich nicht völlig vermeiden läßt. Das dokumentiert sich dadurch, daß neben dem Alkohol lösliche, durch Kohlensäure nicht zersetzbare Kalksalze vorhanden sind. Ihre Beseitigung kann auf doppeltem Wege erreicht werden, entweder entfernt man das gelöste Calcium durch genaue Ausfällung mit Oxalsäure oder in der Siedehitze mit Ammonkarbonat, filtriert und dampft bei niederer Temperatur ein. Durch Ausziehen des resultierenden Syrups mit heißem Alkohol und Fällung mit Äther, mehrfache Wiederholung dieser Prozedur und schließliches Kristallisierenlassen aus heißem Alkohol erhält man endlich reinen Laktobiotit. Durch diese vielfachen Maßnahmen wird die Ausbeute an dem gesuchten Reduktionsprodukt außerordentlich gering und übersteigt ein halbes Gramm nicht. Selbst diese Quantität wird nicht erhalten, wenn man den Calciumkarbonat-Quecksilberschlamm[1]) bei den verschiedenen notwendigen Filtrationen nicht außerordentlich sorgfältig mit siedendem Wasser auswäscht.

Der Laktobiotit bildet eine farblose weiße Kristallmasse ohne scharfen Schmelzpunkt, die Substanz bräunt sich von etwa 200° ab und ist bei 280° noch nicht geschmolzen, doch erhält man hierbei geringe Mengen eines weißen Sublimats. Die Substanz schmeckt schwach süß mit bitterem Nachgeschmack, sie reduziert Fehlingsche Lösung nicht, erlangt aber nach dem Kochen mit Säuren Reduktionsvermögen, offenbar wird sie dabei in d-Galaktose und in d-Sorbit gespalten[2]). $C_{12}H_{24}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{14}O_6$. Die Analyse der im Vakuum bei 40° getrockneten Substanz bestätigte die Formel $C_{12}H_{24}O_{11}$.

[1]) Dieser Schlamm hält eine große Menge von Quecksilber zurück, das daraus nach Herauslösung des Kalks mit verdünnter Salzsäure leicht wiedergewonnen werden kann. Ein Teil des Quecksilbers durchdringt jedoch das Filter, sammelt sich im Filtrat und kann in der üblichen Weise entfernt werden.

[2]) Nach der Hydrolyse einer kleinen Menge (0,25 g) Laktobiotit mit verd. H_2SO_4 und nach deren Entfernung durch $BaCO_3$ resultiert ein reduzierender Zuckersyrup, aus dem man mittels Methylphenylhydrazin leicht reines d-Galaktose-methylphenylhydrazon vom Schmelzpunkt 189 bis 190° isolieren kann, während d-Glukosemethylphenylhydrazon bei 130° schmilzt (C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **35**, 965. 1902).

0,1516 g Subst. gaben 0,2312 g CO_2 und 0,0964 g H_2O.

Ber. für $C_{12}H_{24}O_{11}$: C = 41,86 %; H = 7,00 %.

Gef. „ „ C = 41,58 %; H = 7,14 %.

Der Laktobiotit löst sich leicht in Wasser, schwer in Alkohol und nicht in Äther. Auch in Benzolkohlenwasserstoffen sowie in Chloroform ist er unlöslich.

Der Laktobiotit ist der erste, in reinem kristallisiertem Zustande erhaltene Alkohol eines Disacharides. Der Melibiotit von C. Scheibler und H. Mittelmeier ist nur in sirupöser Form erhalten worden, so daß sich über seinen Reinheitsgrad nichts Sicheres aussagen läßt [1]).

---

[1]) Die Angabe von Scheibler und Mittelmeier (Ber. **22**, 3122. 1889), daß die Hydrolyse des Melibiotits Galaktose und Mannit ergebe, dürfte unzutreffend sein; der neben Galaktose auftretende Alkohol wird d-Sorbit sein. Denn durch Reduktion von Glukose entsteht Sorbit, während Mannit aus der Mannose hervorgeht.

Autorenverzeichnis.

Druck von E. Buchbinder (H. Duske) Neu-Ruppin.



